

(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2004-507213
(P2004-507213A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(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 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 2 G O 5 4
G O 1 N 21/78	G O 1 N 21/78	C 4 B O 2 4
G O 1 N 27/62	G O 1 N 27/62	V 4 B O 6 3
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/15	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く		

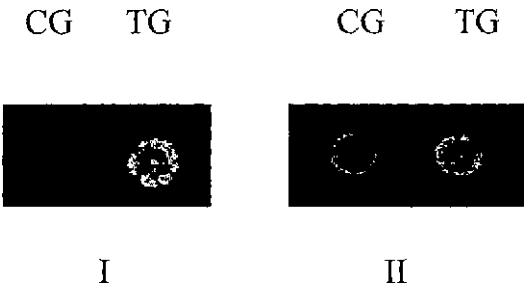
(21) 出願番号 特願2001-567390 (P2001-567390)	(71) 出願人 501198899 エビゲノミクス アーゲー ドイツ国、デー-1 0 4 3 5 ベルリン、 カスタンーンアレー 2 4
(86) (22) 出願日 平成13年3月15日 (2001.3.15)	
(85) 翻訳文提出日 平成14年9月17日 (2002.9.17)	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/002945	
(87) 国際公開番号 W02001/068911	(74) 代理人 100088904 弁理士 庄司 隆
(87) 国際公開日 平成13年9月20日 (2001.9.20)	
(31) 優先権主張番号 100 13 847.0	(72) 発明者 オレックス アレグザンダー ドイツ 1 0 1 1 5 ベルリン シュロー デルストラッセ 1 3 / 2
(32) 優先日 平成12年3月15日 (2000.3.15)	
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)	(72) 発明者 ビーベンブロック クリスチャン ドイツ 1 0 1 1 5 ベルリン シュワル ツコッフストラッセ 7 b
(31) 優先権主張番号 100 19 058.8	
(32) 優先日 平成12年4月6日 (2000.4.6)	(72) 発明者 ベリン クルト ドイツ 1 4 5 3 2 スタンズドルフ マ リエンケッフエルウエグ 4
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)	
(31) 優先権主張番号 100 19 173.8	
(32) 優先日 平成12年4月7日 (2000.4.7)	
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)	
最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】細胞周期に関連する疾患の診断

(57) 【要約】

本発明は、細胞周期に関連する遺伝子の化学的に修飾されたゲノム配列と、この配列に向けられた細胞周期に関連する遺伝子のシトシンメチル化状態を検出するオリゴヌクレオチド及び／又は PNA - オリゴマーと、細胞周期に関連する遺伝子の遺伝的及び／又はエビジェネティクスパラメータを確認する方法とに関する。本発明は、細胞周期に関連する遺伝子の遺伝的及びエビジェネティクスパラメータと、特にそのシトシンメチル化パターンとが細胞周期に関連する疾患の診断及び／又は治療に特に適していることを見出したことに基づいている。

【選択図】図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列 I D 番号 1 乃至配列 I D 番号 4 2 4 のグループから取り出した配列の一つ及びこれの相補配列に従った、細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A のセグメントの少なくとも 1 8 塩基の長さである配列を含む核酸。

【請求項 2】

遺伝子 C C N B 1 (M 2 5 7 5 3)、C C N E 1 (M 7 3 8 1 2) (M 7 4 0 9 3)、D E N R (O 4 3 5 8 3)、E P H A 5 (L 3 6 6 4 4)、M C M 4 (X 7 4 7 9 4)、N E K 3 (Z 2 9 0 6 7)、P C T K 3 (X 6 6 3 6 2)、P R K A R 1 B (M 6 5 0 6 6)、P R K C G (M 1 3 9 7 7) (Z 1 5 1 1 4)、P R K M 3 (M 8 4 4 9 0) (Z 1 1 6 9 6)、P R K M K 2 (L 1 1 2 8 5)、Z A P 7 0 (L 0 5 1 4 8)、A C P 1 (N M _ 0 0 4 3 0 0)、A K T 1 (N M _ 0 0 5 1 6 3)、B M P R 2 (N M _ 0 0 1 2 0 4)、D D R 1 (N M _ 0 1 3 9 9 3)、C C N D 3 (N M _ 0 0 1 7 6 0)、C C N F (N M _ 0 0 1 7 6 1)、C H E S 1 (N M _ 0 0 5 1 9 7)、C L K 3 (N M _ 0 0 3 9 9 2)、D Y R K 1 (N M _ 0 0 1 3 9 6)、E F N A 1 (N M _ 0 0 4 4 2 8)、I F I T 1 (N M _ 0 0 1 5 4 8)、S C Y B 1 0 (N M _ 0 0 1 5 6 5)、I N P P 5 D (N M _ 0 0 5 5 4 1)、I S G 2 0 (N M _ 0 0 2 2 0 1)、L Y 6 E (N M _ 0 0 2 3 4 6)、P C N A (N M _ 0 0 2 5 9 2)、P I K 3 C A (N M _ 0 0 6 2 1 8)、P P P 1 R 3 (N M _ 0 0 2 7 1 1)、P T P N 7 (N M _ 0 0 2 8 3 2)、P T P N 9 (N M _ 0 0 2 8 3 3)、R H O K (N M _ 0 0 2 9 2 9)、R Y K (N M _ 0 0 2 9 5 8)、E P H B 3 (N M _ 0 0 4 4 4 3)、P P P 3 C A (N M _ 0 0 0 9 4 4)、P R K C A (N M _ 0 0 2 7 3 7)、P R K G 1 (N M _ 0 0 6 2 5 8)、M A P K 1 0 (N M _ 0 0 2 7 5 3)、M A P K 6 (N M _ 0 0 2 7 4 8)、P T P R C (N M _ 0 0 2 8 3 8)、P T P R D (N M _ 0 0 2 8 3 9)、P T P R G (N M _ 0 0 2 8 4 1)、R B L 1 (N M _ 0 0 2 8 9 5)、S T K 3 (N M _ 0 0 6 2 8 1)、T G F B 1 (N M _ 0 0 0 3 5 8) に従った配列の一つ及びこれの相補配列に従った、細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A のセグメントの少なくとも 1 8 塩基の長さである配列を含む核酸。

【請求項 3】

オリゴマー、特にオリゴヌクレオチド又はペプチド核酸 (P N A) - オリゴマーであって、請求項 1 記載の配列 I D 番号 1 乃至 4 2 4 の一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A 又は請求項 2 記載の遺伝子の化学的前処理された D N A 及びこれの相補配列とハイブリッド形成する又は同一である、少なくとも九個のヌクレオチドの長さを有する少なくとも一つの塩基配列をいずれの場合でも含むオリゴマー。

【請求項 4】

塩基配列が少なくとも一つの C p G ジヌクレオチドを含む、請求項 3 記載のオリゴマー。

【請求項 5】

C p G ジヌクレオチドのシトシンが、オリゴマーの三分の一のほぼ中央に位置することを特徴とする、請求項 4 記載のオリゴマー。

【請求項 6】

請求項 3 乃至 5 のいずれか一項に記載の少なくとも二つのオリゴマーを含む、オリゴマーのセット (s e t)。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の配列 I D 番号 1 乃至 4 2 4 に従った又は請求項 2 に記載の遺伝子の化学的前処理された D N A に従った配列の一つとこれの相補配列とからすべての C p G ジヌクレオチドのメチル化状態を検出するオリゴマーを含む、請求項 6 記載のオリゴマーのセット (s e t)。

【請求項 8】

配列 I D 1 乃至配列 I D 4 2 4 の一つの D N A 配列及びこれの相補配列、及び / 又は請求項 2 に記載の遺伝子の化学的前処理された D N A の配列、及びこれの相補配列、又はその

10

20

30

40

50

セグメントの増殖のためのプライマーオリゴヌクレオチドとして使用することが可能な、請求項 3 記載の少なくとも二つのオリゴヌクレオチドのセット (s e t)。

【請求項 9】

少なくとも一つのオリゴヌクレオチドが固相に固定されていることを特徴とする、請求項 8 記載のオリゴヌクレオチドのセット (s e t)。

【請求項 10】

請求項 1 記載の化学的前処理されたゲノム DNA 又は請求項 2 に記載の遺伝子の化学的前処理された DNA におけるシトシンメチル化状態及び / 又は単一ヌクレオチド多型 (S N P) を検出する請求項 6 乃至 9 のいずれか一項に記載の少なくとも十個のオリゴマーを含む、オリゴマープローブのセット (s e t) の使用。

10

【請求項 11】

配列 I D 1 乃至配列 I D 4 2 4 の一つ及びこれの相補配列及び / 又は請求項 2 記載の遺伝子の化学的前処理された DNA の C p G ジヌクレオチドのメチル化状態に関連する疾患を分析する、キャリアー材料に固定された様々なオリゴマーの配置 (アレイ) を製造する方法であって、請求項 3 乃至 5 のいずれか一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 12】

請求項 11 により得ることが可能な、様々なオリゴマーの配置 (アレイ) 。

【請求項 13】

長方格子又は六方格子の形態で平坦な固相上に配置されることを特徴とする、請求項 1 2 記載の様々なオリゴヌクレオチド - 及び / 又は P N A - オリゴマーのアレイ。

20

【請求項 14】

固相表面が、シリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、スチール、鉄、銅、ニッケル、銀、又は金によって構成されることを特徴とする、請求項 1 2 又は 1 3 記載のアレイ。

【請求項 15】

前記請求項のいずれか一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態に関連する疾患を分析する DNA - 及び / 又は P N A - アレイ。

【請求項 16】

シトシンメチル化を分析することで、既存の疾患或いは特定の疾患の素因に関する診断及び / 又は治療のための遺伝的及び / 又はエピジェネティクスパラメータを確認する方法であって、

30

a) ゲノム DNA 試料において、5 位置においてメチル化されていないシトシン塩基を、化学処理によって、ウラシル又はハイブリッド形成行動に関してシトシンと類似しない別の塩基に転換するステップと、

b) 化学的前処理されたゲノム DNA の断片が、請求項 8 又は 9 記載のプライマーオリゴヌクレオチドのセット (s e t) 及びポリメラーゼを使用して増幅され、増幅物が検出可能な標識を伴うステップと、

c) 増幅物が、請求項 6 又は 7 記載のオリゴヌクレオチド及び / 又は P N A プローブのセット (s e t) 、或いは請求項 1 2 乃至 1 5 のいずれか一項に記載のアレイとハイブリッド形成するステップと、

40

d) ハイブリッド形成された増幅物が、その後、検出されるステップと、
が実行されることを特徴とする方法。

【請求項 17】

化学的処理が、重亜硫酸塩 (b i s u l f i t e) 、亜硫酸水素塩、又は二亜流酸塩の水溶液を用いて実行されることを特徴とする、請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 18】

1 0 0 乃至 2 0 0 0 塩基対の長さを有する 1 0 より多くの異なる断片が増幅されることを特徴とする、請求項 1 6 又は 1 7 の一方に記載の方法。

【請求項 19】

50

いくつかのDNAセグメントの増幅が、一つの反応槽において実行されることを特徴とする、請求項16乃至18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

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16乃至19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)方法を用いて実行されることを特徴とする、請求項20記載の方法。

【請求項22】

増幅の標識が、蛍光標識であることを特徴とする、請求項16乃至21のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項23】

増幅の標識が、放射性核種であることを特徴とする、請求項16乃至21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

増幅の標識が、質量分析計において検出される通常の質量を有する分離可能な分子断片であることを特徴とする、請求項16乃至21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

増幅物又は増幅物の断片が、質量分析計において検出されることを特徴とする、請求項16乃至21のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項26】

生成された断片が、質量分析計での検出可能性を高めるために、単一の正又は負の実効電荷を有することを特徴とする、請求項24及び/又は25の一方に記載の方法。

【請求項27】

検出が、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI)を用いて、或いは電子スプレ質量分析法(ESI)を使用して、実行及び視覚化されることを特徴とする、請求項24乃至26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

ゲノムDNAが、DNAを含む細胞又は細胞構成要素から得られ、DNAのソースが例えば、細胞系と、パイオプシーと、血液と、唾液と、大便と、尿と、脳脊髄液と、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房、又は肝臓からの組織等のパラフィンに埋め込まれた組織と、ヒストロジックオブジェクトスライド(histologic object slides)と、又はこれらにおいて可能なあらゆる組み合わせとを含むことを特徴とする、請求項16乃至27のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項29】

重亜硫酸塩(bisulfite)(=二亜硫酸塩、亜硫酸水素塩)試薬と、請求項3乃至5のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド及び/又はPNA-オリゴマを備えるキット。

【請求項30】

HIV感染と、神経変性疾患と、移植片対宿主疾患と、老化と、糸球体疾患と、レービ小体疾患と、関節炎と、動脈硬化と、充実性腫瘍と、癌との診断のための、請求項1又は2に記載の核酸と、請求項3乃至5のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド又はPNA-オリゴマーと、請求項29に記載のキットと、請求項12乃至15のいずれか一項に記載のアレイと、請求項6乃至9のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドのセット(set)との使用。 40

【請求項31】

HIV感染と、神経変性疾患と、移植片対宿主疾患と、老化と、糸球体疾患と、レービ小体疾患と、関節炎と、動脈硬化と、充実性腫瘍と、癌との治療のための、請求項1又は2に記載の核酸と、請求項3乃至5のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド又はPNA-オリゴマーと、請求項29記載のキットと、請求項12乃至15のいずれか一項に記載 50

のアレイと、請求項 6 乃至 9 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドのセット (s e t) との使用。

【請求項 3 2】

重亜硫酸塩 (b i s u l f i t e) (= 二亜硫酸塩、亜硫酸水素塩) 試薬と、請求項 3 乃至 5 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド及び / 又は P N A - オリゴマーを備えるキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分子生物学における近年の方法論の発展を受けて、遺伝子自体と、こうした遺伝子の R N A への転換と、結果として生じるタンパク質との観察 (治療) レベルにおいて広く研究が行われてきた。個体の成長過程のどの時点においてどの遺伝子のスイッチが入るかという問題、及び特定の細胞及び組織内の特定の遺伝子の活性化及び抑制がどのように制御されるかという問題は、遺伝子又はゲノムのメチル化の程度及び特徴と関連させることができる。この点において、発病条件は、個別の遺伝子又はゲノムの変化したメチル化パターンに現れる可能性がある。

本発明は、核酸と、オリゴヌクレオチドと、P N A オリゴマーとに関し、細胞周期及び特にそのメチル化状態に関連する遺伝子の遺伝的及び / 又はエピジェネティクスパラメータとのつながりを有する疾患の診断及び / 又は治療のための方法に関する。

【従来の技術】

【0002】

細胞周期は、各減数分裂間の一連の事象で、細胞が二つの娘細胞に分裂することで完了する。この周期は、G 1、S、G 2、及びM期という4種類の個別の段階によって構成される。核及び細胞質の分裂は、M (分裂) 期に発生し、D N A の複製は、S 期に発生する。M 期の終了とS 期の開始との間の期間は、G 1 と呼ばれ、S 期の終了とM 期の開始との間の段階は、G 2 と呼ばれる。

【0003】

こうした段階と一つの段階から次の段階への進行とを調整することは、順序化された細胞分裂の調整において重要な要素である。一つの段階から次の段階への一方向性の進行は、様々な生化学的「チェックポイント」において制御される。こうした「チェックポイント」又は生化学経路は、大きな関心に値し、こうした経路内での変化により、染色体の複製及び分離といった細胞周期に関連する事象の忠実性が減少する場合がある。

【0004】

哺乳類の細胞において、G 1 は、最も重要なチェックポイントを意味する。この時点において、細胞は、D N A 複製に集中し、増殖を調整する。他のチェックポイントは、S 期において複製した染色体の完全性をチェックする時、及びG 2 において細胞質分裂に集中する時に存在する。この時点で細胞が分裂しない場合、細胞は、染色体の補体 (c o m p l e m e n t) を通常の二倍有する状態を維持する。

【0005】

調整システムは、経路の次の構成物をリン酸化又は脱リン酸化することで外的信号及びチェックポイントに反応する一連の酵素で構成される。リン酸化は、サイクリン依存性キナーゼによって触媒される。こうしたホロ酵素は、調整サブユニット (サイクリン) 及び関連触媒サブユニット (サイクリン依存性キナーゼ又は C D K) という二種類のタンパク質サブユニットによって構成される。これらは、多くのレベルの調整を受け、両方とも、調整回路自体の活動の制御と、調整回路の決定を実行する基質の活動の制御とに使用される。一般に、異なるタイプのサイクリンは、文字によって表され (サイクリン A、サイクリン B 等)、C D K は、数字によって区別される (C D K 1、C D K 2 等)。細胞周期調整因子の役割は、Stephen E l l e d g e の " J . C e l l C y c l e C h e c k p o i n t s : P r e v e n t i n g a n I d e n t i t y C r i s i s " S c i e n c e , 2 7 4 ; 1 6 6 4 - 1 6 7 2 (1 9 9 6) において概説されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

細胞周期の誤調整は増殖につながる可能性があり、細胞周期調整因子は、多数の疾患、特に腫瘍の形成に、関与するとされてきた。細胞周期経路の崩壊に伴う疾患の例には、以下が含まれる。

【 0 0 0 7 】

1. HIV感染。Zhou及びRatner、" Phosphorylation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Regulates Cell Cycle Arrest " Journal of Virology, Vol. 74; 6520 - 6527 (2000)。
2. アルツハイマー病。Brucknerら、" Aberrancies in signal transduction and cell cycle related events in Alzheimer's disease. " J Neural Transm Suppl; 54: 147 - 58 (1998)。
3. 移植片対宿主疾患。Boussiotisら、" Altered T-cell receptor + CD28-mediated signaling and blocked cell cycle progression in interleukin 10 and transforming growth factor-beta-treated alloreactive T cells that do not induce graft-versus-host disease. " Blood ; 97 (2) : 565 - 571 (2001)。
4. 老化。Zhuら、" Neuronal CDK7 in hippocampus is related to aging and alzheimer disease " Neurobiol Aging ; 21 (6) : 807 - 13 (2000)。
5. 糸球体疾患。Shanklandら、" Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitor s in human glomerular disease: role in podocyte proliferation and maturation. " Kidney Int ; 58 (2) : 674 - 83 (2000)。
6. レービ小体疾患。Takahashiら、" Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) associated with Lewy bodies in diffuse Lewy body disease. " Brain res . 17 ; 862 (1 - 2) : 253 - 6 (2000)。
7. 関節炎。Kohsakaら、" Treatment of arthritis with cyclin-dependent kinase inhibitor P16INK4a gene " Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi ; 22 (6) : 397 - 9 (1999)。
8. 神経変性疾患。Patrickら、" Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration " Nature 9 ; 402 (6762) : 615 - 22 (1999)。
9. 動脈硬化。Ihlingら、" Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions. " J Pathol ; 185 (3) : 303 - 12 (1998)。
10. 毛細血管拡張性運動失調。Matsuokaら、" Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase " Science, Vol. 282 ; 1893 - 1897 (1998)。
11. 膀胱癌。Del Pizzolaら、" Loss of Cell Cycle Re

10

20

30

40

50

- gulators p27Kipl and Cyclin E in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder Correlates with Tumor Grade and Patient Survival" American Journal of Pathology, Vol. 155: 1129 - 1136 (1999)。
12. 白血病。Vrhovacら、"Prognostic Significance of the Cell Cycle Inhibitor p27Kipl in Chronic B-Cell Lymphocytic Leukemia" Blood Vol. 91; 4694 - 4700 (1998)。
13. 結腸直腸癌。Thomas G. V、"Down-Regulation of p27 Is Associated with Development of Colorectal Adenocarcinoma Metastases" American Journal of Pathology; 153; 681 - 687 (1998)。
14. 胃癌。Takani Y、"Cyclin D2 Overexpression and Lack of p27 Correlate Positively and Cyclin E Inversely with a Poor Prognosis in Gastric Cancer Cases" American Journal of Pathology; 156; 585 - 594 (2000)。
15. 肝臓癌。Albrecht J、"Regulation of GI cyclin-dependent kinases in the liver: role of nuclear localization and p27 sequestration" Vol. 277; 1207 - G1216, (1999)。
16. 肺癌。Nabeyrat E、"Retinoic acid-induced proliferation of lung alveolar epithelial cells is linked to p21CIP1 downregulation" Vol. 278; 42 - L50, (2000)。
17. 前立腺癌、De Marzo A、"Expression of the Cell Cycle Inhibitor p27Kipl in, normal, Hyperplastic, and Neoplastic Cells" American Journal of Pathology; 153; 911 - 919 (1998)。

【0008】

DNAのメチル化は、遺伝子発現の正確な調整において必須要素である。例えば、p16タンパク質は、G1/S境界で細胞周期の進行を停止させ、p16作用の欠如は、無秩序な細胞増殖を可能にすることで癌の進行につながる場合がある。高メチル化が仲介するp16遺伝子の不活性化は、脳腫瘍と、乳癌と、結腸癌と、頭部及び頸部癌と、非小細胞肺癌と、高度非ホジキンリンパ腫において実証されている。他の研究も、メチル化と遺伝子調整との間のつながりを立証しており、これには、Jacksonらの"Loss of genomic methylation causes p53 dependent apoptosis and epigenetic deregulation" Nature Genetics 27; 31 - 39 (2001)が含まれ、これはいくつかの重要な細胞周期遺伝子の異常な発現パターンを示している。

【0009】

細胞周期遺伝子のメチル化依存調整の同定は、癌治療及び診断の代替方法を開発する可能性を広げるものである。DNAメチル化阻害因子による治療は、重要な細胞周期遺伝子p16の遺伝子発現を修復するものとして示されている。Benderら、"Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines." Cancer research 58; 95 - 101 (1998)。これにより、腫瘍細胞系の成長の抑制につながる遺伝的レベルの遺

伝子発現が生じた。

【0010】

メチル化ベースの治療は、化学療法、外科処置、及び放射線治療といった現行の治療方法に比べ、大きな利点を有する可能性がある。こうした治療は、従来の治療方法に対する耐性がある腫瘍を治療する手段を提供する可能性もあり、これは、Soengasらの "Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma" Nature 409; 207-211 (2001) によって実証されている。加えて、メチル化特異的治療の開発に加え、Minマウスでの実験は、DNAメチル化の阻害が腫瘍の発生を抑制できることを示している。Lairdら、"Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation" Cell 81; 197-205 (1995)。更に、DNAメチル化分析は、癌診断の新しい手段を提供する可能性がある。

10

【0011】

5 - メチルシトシンは、真核細胞のDNAにおいて最も多い共有塩基修飾である。これは、例えば、転写の調整と、遺伝子の刷り込みと、腫瘍形成とにおいて役割を果たす。そのため、遺伝情報の構成要素として5 - メチルシトシンを特定することは、大きな関心に値する。しかしながら、5 - メチルシトシンはシトシンと同じ塩基対合行動を有するため、5 - メチルシトシンの位置は、配列決定では特定不可能である。更に、5 - メチルシトシンが伴うエピジェネティクス情報は、PCR増幅中に完全に失われる。

20

【0012】

5 - メチルシトシンに関してDNAを分析するために、比較的新しく、現在最も頻繁に使用される方法は、重亜硫酸塩のシトシンとの特定の反応に基づいており、結果として生じるアルカリ加水分解により、シトシンは塩基対合行動においてチミジンに対応するウラシルに転換される。しかしながら、5 - メチルシトシンは、こうした条件下では修飾されないうまま残る。その結果、元のDNAは、ハイブリッド形成行動によって当初識別できなかったメチルシトシンを、例えば増幅及びハイブリッド形成又は配列決定等、「通常」の分子生物学的手法を使用して唯一残存するシトシンとして検出できる。こうしたすべての手法は、十分に利用することが可能となっている塩基対合に基づいている。感度の点において、従来技術は、分析されるDNAをアガロースマトリックスで囲み、DNAの拡散及び復元を防ぎ（重亜硫酸塩は一本鎖DNAとのみ反応する）、すべての沈殿及び浄化ステップを高速透析に置き換える方法によって定められる（Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphate based cytosine methylation analysis. Nucleic Acid Res. 1996 Dec 15; 24(24): 5064-6）。この方法を使用することで、個々の細胞を分析することが可能となり、これらの方法のすなわち意義を示すものである。しかしながら、現在、約3000塩基対までの長さの個別領域のみが分析されており、数千のメチル化事象の可能性に関する細胞の広範囲的分析は不可能である。また、しかしながら、この方法は、小さな量の試料からの非常に小さな断片を高い信頼性で分析することはできない。これらは、拡散防止措置にもかかわらず、マトリックスを通じて失われてしまう。

30

40

【0013】

5 - メチルシトシンを検出する更なる既知の方法の概要は、次の総論から得ることができる。Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255。

【0014】

現在まで、僅かな例外を除き（例えば、Zeschning M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi Syndrome based on a

50

allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar - Apr; 5 (2): 94 - 8)、重亜硫酸塩 (bisulfite) 手法は調査のみに使用されている。しかしながら、常に、既知である短い特定の断片は、重亜硫酸塩処理の後で増幅され、完全に配列決定されるか (Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. Nat Genet. 1997 Nov; 17 (3): 275 - 6)、或いは、プライマ延長反応によって (Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15; 25 (12): 2529 - 31, WO出願 95/00669) 又は酵素的な消化によって (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acid res. 1997 Jun 15; 25 (12): 2532 - 4)、個々のシトシン位置が検出される。加えて、ハイブリッド形成による検出も述べられている (Olekら、WO 99/28498)

【0015】

個々の遺伝子でのメチル化検出に関する重亜硫酸塩手法の使用を扱っているさらなるその他の出版物は、次の通りである。Grigg G, Clark S. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. Bioessays. 1994 Jun; 16 (6): 431 - 6, 431。Zeschningk M, Schmitz B, Ditttrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. Hum Mol Genet. 1997 Mar; 6 (3): 387 - 95。Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphate genomic sequencing. Nucleic Acids Res. 1994 Feb 25; 22 (4): 695 - 6。Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. Gene. 1995 May 19; 157 (1 - 2): 261 - 4。WO 97 46705、WO 95 15373、及び WO 45560。

【0016】

オリゴマーアレイ製造における従来技術の概要は、1999年1月に刊行された Nature Genetics の特別版 (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) と、そこに引用された文献とから得ることができる。

【0017】

蛍光標識プローブは、固定化DNAアレイのスキャニングに使用される場合が多い。特定のプローブの5'-OHに対するCy3及びCy5色素の容易な添加は、蛍光標識に特に適している。ハイブリッド形成されたプローブの蛍光の検出は、例えば、共焦点顕微鏡を

10

20

30

40

50

介して実行することができる。Cy 3 及び Cy 5 色素は、他の多くの色素同様、市販されている。

【0018】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-TOF) は、生体分子の分析に関する非常に効率的な成果である (Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct 15; 60(20): 2299-301)。検体は、ライト (light) マトリックスに埋め込まれる。このマトリックスは、短レーザーパルスによって蒸発するため、検体分子を断片化せずに気相へと移行させる。検体は、マトリックス分子との衝突によってイオン化する。給与電圧により、このイオンは、フィールドフリー飛行管へ加速される。質量の違いにより、このイオンは、異なる速度で加速される。小さなイオンは、大きなイオンよりも早く検出器に到達する。

10

【0019】

MALDI-TOF 分析法は、ペプチド及びタンパク質の分析に非常に適している。核酸の分析は、多少困難である (Gut IG, Beck S. DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Current Innovations and Future Trends. 1995, 1: 147-57)。核酸に対する感度は、ペプチドに対する感度よりも約 100 倍劣っており、断片のサイズの増加とは反比例して感度は減少する。多重負電荷バックボーンを有する核酸では、マトリックスを介したイオン化プロセスの効率は、大幅に低下する。MALDI-TOF 分析法において、マトリックスの選択は、非常に重要な役割を果たす。ペプチドの脱離に関しては、非常に微細な結晶体を生成する極めて効率的なマトリックスがいくつか発見されている。現在では、DNA に関する反応性マトリックスがいくつか存在するが、しかしながら、感度の格差は低減されていない。感度の格差は、DNA がペプチドに類似するような形で DNA を化学的に修飾することで低減させることができる。バックボーンの通常のリン酸塩がチオリン酸塩に置換したホスホロチオエート核酸は、単純なアルキル化化学反応を使用して電荷中立 DNA に転換することができる (Gut IG, Beck S. A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 1995 Apr 25; 23(8): 1367-73)。この修飾済み DNA に電荷タグを結合させることで、ペプチドに関してみられるものと同じレベルまで感度が増加する。電荷タグ付加の更なる利点は、未修飾の基質の検出を非常に困難にする不純物に対する分析の安定性を増加させることである。

20

30

【0020】

ゲノム DNA は、標準的な方法を使用して、細胞、組織、又はその他の試験試料の DNA から取得される。この標準的な方法は、Fritsch 及び Maniatis 編の Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989 といった参考文献に記載されている。

40

【発明が解決しようとする問題】

【0021】

前記を考慮すると、本発明の目的は、細胞周期に関連する遺伝子の化学的に修飾された DNA と、シトシンメチル化を検出するためのオリゴヌクレオチド及び / 又は PNA オリゴマーと、細胞周期に関連する遺伝子の遺伝的及びエピジェネティクスパラメータの診断及び / 又は治療に特に適した方法とを提供することである。本発明は、細胞周期に関連する遺伝子の遺伝的及びエピジェネティクスパラメータと、特にそのシトシンメチル化パターンとが細胞周期に関連する疾患の診断及び / 又は治療に特に適していることを見出したことに基づいている。

【発明を解決するための手段】

50

【 0 0 2 2 】

本発明による目的は、配列 I D 番号 1 乃至配列 I D 番号 4 2 4 のうち一つ及びこれの相補配列に従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A 及び / 又は表 1 記載の遺伝子配列のうち一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A の少なくとも 1 8 塩基の長さの配列を含む核酸を提供することで、達成される。この表において、列挙された遺伝子の記号表示の後には、付随する遺伝子配列を固有のものとして定めるそれぞれのデータバンク番号（アクセッション番号）が指定されている。基盤となるデータバンクとして、国立保健研究所の G e n B a n k を使用しており、インターネットアドレスは www.ncbi.nlm.nih.gov である。

【 0 0 2 3 】

化学的に修飾された核酸は、これまで、遺伝的及びエピジェネティクスパラメータの確認とは関連付けられていない。

【 0 0 2 4 】

本発明の目的は、配列 I D 番号 1 乃至配列 I D 番号 4 2 4 及びこれの相補配列に従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A 及び / 又は表 1 記載の配列のうち一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A とハイブリッド形成する少なくとも 1 3 ヌクレオチドの長さを有する少なくとも一つの塩基配列を含む、化学的前処理された D N A におけるシトシンメチル化状態を検出するためのオリゴヌクレオチド又はオリゴマーによって、更に達成される。本発明によるオリゴマープローブは、細胞周期に関連する遺伝子の遺伝的及びエピジェネティクスパラメータを確認することを初めて可能にする重要かつ効果的なツールを構成する。オリゴマーの塩基配列は、好ましくは、少なくとも一つの C p G ジヌクレオチドを含む。このプローブは、特に好適な対合特性を有する P N A（ペプチド核酸）の形態で存在することもできる。本発明によるオリゴヌクレオチドで特に好適なものは、1 3 - m e r の 5 ' 末端からの五番目乃至九番目の C p G ジヌクレオチドであり、P N A - オリゴマーの場合は、C p G ジヌクレオチドのシトシンが 9 - m e r の 5 ' 末端からの四番目及び六番目のヌクレオチドとなるのが好適である。

【 0 0 2 5 】

本発明によるオリゴマーは、配列 I D 番号 1 乃至配列 I D 番号 4 2 4 の配列及びこれの相補配列の C p G ジヌクレオチド及び / 又は表 1 記載の遺伝子配列のうち一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A のそれぞれに関して少なくとも一つのオリゴマーを含むいわゆる「セット（s e t）」において通常使用される。好適なものは、配列 I D 番号 1 乃至配列 I D 番号 4 2 4 のうち一つ及びこれの相補配列からの C p G ジヌクレオチド及び / 又は表 1 記載の遺伝子配列のうち一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A のそれぞれに関して少なくとも一つのオリゴマーを含むセット（s e t）である。

【 0 0 2 6 】

更に、本発明は、配列 I D 番号 1 乃至配列 I D 番号 4 2 4 のうち一つの D N A 配列及びこれの相補配列及び / 又は表 1 記載の遺伝子又はそのセグメントの配列のうち一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A の配列とを増幅するいわゆる「プライマーオリゴヌクレオチド」として使用可能な少なくとも二つのオリゴヌクレオチドのセット（s e t）を利用可能にする。

【 0 0 2 7 】

本発明によるオリゴヌクレオチドのセット（s e t）の場合、少なくとも一つのオリゴヌクレオチドが固相に固定されることが好適である。

【 0 0 2 8 】

本発明は、化学的前処理されたゲノム D N A（配列 I D 番号 1 乃至配列 I D 番号 4 2 4 及びこれの相補配列及び / 又は表 1 記載の遺伝子の配列のうち一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A の配列）におけるシトシンメチル化状態を検出するために使用される少なくとも 1 0 n のセット（s e t）（オリゴヌクレオチド及び / 又は P N A - オリゴマー）に更に関する。こうしたプローブにより、細胞周期に関連する遺

10

20

30

40

50

伝子の遺伝的及びエピジェネティクスパラメータの診断及び／又は治療が可能となる。このオリゴマーのセット (s e t) は、配列 I D 番号 1 乃至配列 I D 番号 4 2 4 のうち一つ及びこれの相補配列に従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A 及び／又は表 1 記載の遺伝子配列のうち一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A の配列において単一ヌクレオチド多型 (S N P) を検出するために使用することもできる。

【 0 0 2 9 】

本発明によれば、本発明によって利用可能となる、異なるオリゴヌクレオチド及び／又は P N A - オリゴマーの配置 (いわゆる「アレイ」) は、同様に固相に固定される形で存在することが好適である。この異なるオリゴヌクレオチド及び／又は P N A - オリゴマー配列のアレイは、長方格子又は六方格子の形態で固相上に配置されることによって特徴付けることができる。固相表面は、好ましくは、シリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、スチール、鉄、銅、ニッケル、銀、又は金によって構成される。しかしながら、ニトロセルロースと、ペレットの形態又は樹脂基質として存在することが可能なナイロン等のプラスチックとも利用可能である。

10

【 0 0 3 0 】

そのため、本発明の主題は、細胞周期に関連する疾患と関係する分析のためのキャリア材料に固定されたアレイを製造する方法であり、この方法においては、本発明に従った少なくとも一つのオリゴマーが固相に結合される。こうしたアレイを製造する方法は、例えば、固相化学反応及び光変性保護基を用いる米国特許第 5 , 7 4 4 , 3 0 5 号により知られている。

20

【 0 0 3 1 】

本発明の更なる主題は、本発明に従った少なくとも一つの核酸を含む細胞周期に関連する疾患の分析のための D N A チップに関する。D N A チップは、米国特許第 5 , 8 3 7 , 8 3 2 号により知られている。

【 0 0 3 2 】

更に、本発明の主題は、例えば、重亜硫酸塩 (b i s u l f i t e) 含有試薬と、いずれの場合にも、付録で指定する塩基配列 (配列 I D 番号 1 乃至配列 I D 番号 4 2 4 及びこれの相補配列及び／又は表 1 記載の遺伝子配列のうち一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された D N A の配列) の 1 8 塩基の長さのセグメントに対応する配列又はこのセグメント相補配列を有する少なくとも二つのオリゴヌクレオチドを含むプライマーオリゴヌクレオチドのセット (s e t) と、オリゴヌクレオチド及び／又は P N A - オリゴマーと、説明された方法を実行及び評価するための指示書とによって構成されるキットである。しかしながら、本発明に沿ったキットは、上で述べた構成要素の一部のみを含むこともできる。

30

【 0 0 3 3 】

本発明により、シトシンメチル化及び単一ヌクレオチド多型を分析することで、細胞周期に関連する遺伝子の遺伝的及び／又はエピジェネティクスパラメータを確認する方法も利用可能となり、これは以下のステップを含む。

【 0 0 3 4 】

この方法の第一のステップにおいて、ゲノム D N A 試料は、5 ' - 位置においてメチル化していないシトシン塩基がウラシル、チミン、又はハイブリッド形成行動に関してシトシンと類似しない別の塩基に転換される形で、化学的に処理される。これは、以下において「化学的前処理」として理解されるものとする。

40

【 0 0 3 5 】

分析されるゲノム D N A は、好ましくは、細胞又は細胞構成要素といった D N A の通常のソースから取得され、これは例えば、細胞株と、バイオプシーと、血液と、唾液と、大便と、尿と、脳脊髄液と、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房、又は肝臓からの組織等のパラフィンに埋め込まれた組織と、ヒストロジカルオブジェクトスライド (h i s t o l o g i c a l o b j e c t s l i d e s) と、又はその組み合わせとである。

50

【0036】

上で説明したゲノムDNAの処置は、好ましくは、重亜硫酸塩（bisulfite）（亜硫酸水素塩、二亜硫酸塩）と、続いてアルカリ加水分解によって実行され、このアルカリ加水分解によって、非メチル化シトシンはウラシル、或いは塩基対合行動に関してシトシンと類似しない別の塩基に転換される。

【0037】

化学的前処理されたDNAの断片は、本発明に従ったプライマーオリゴヌクレオチドのセット（set）と、好ましくは、熱安定性ポリメラーゼとを使用して、増幅される。統計的及び実地的な考慮から、好ましくは、100乃至2000塩基対の長さを有する10より多くの異なる断片を増幅する。いくつかのDNAセグメントの増幅は、一つの同じ反応槽において、同時に実行することができる。通常、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）方法を用いて実行される。

10

【0038】

この方法の好適な実施形態において、プライマーオリゴヌクレオチドのセット（set）は、付録において指定された塩基配列（配列ID番号1乃至配列ID番号424及びこれらの相補配列及び／又は表1記載の遺伝子配列のうち一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理されたDNAの配列）の少なくとも18塩基対の長さのセグメントをそれぞれ逆相補する配列又はこれと同一の配列を有する少なくとも二つのオリゴヌクレオチドを含む。このプライマーオリゴヌクレオチドは、好ましくは、CpGジヌクレオチドをまったく含まない点で特徴付けられる。

20

【0039】

本発明によれば、少なくとも一つのプライマーオリゴヌクレオチドは、増幅中に固相に接合されている。様々なオリゴヌクレオチド及び／又はPNA-オリゴマー配列を、長方形格子又は六方格子の形態で、平坦な固相上に配置することが可能であり、固相表面は、好ましくは、シリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、スチール、鉄、銅、ニッケル、銀、又は金によって構成され、ニトロセルロース又はプラスチック等の他の材料を使用することも可能である。

【0040】

増幅を用いて得られる断片は、検出可能な標識を直接的又は間接的に伴うことができる。好適なものは、蛍光標識、放射性核種、又は質量分析計において検出できる通常の質量を有する分離可能な分子断片の形態の標識であり、質量分析計での検出可能性を高めるために、生成される断片は単一の正又は負の実行電荷を有することが好適である。この検出は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI）を用いて、或いは電子スプレー質量分析法（ESI）を使用して、実行及び視覚化することができる。

30

【0041】

この方法の第二のステップで得られた増幅物は、その後、オリゴヌクレオチド及び／又はPNAプローブのアレイ又はセット（set）とハイブリッド形成する。この状況において、ハイブリッド形成は、以下の説明の形で行われる。ハイブリッド形成中に使用されるプローブのセット（set）は、好ましくは、少なくとも十個のオリゴヌクレオチド又はPNA-オリゴマーで構成される。このプロセスにおいて、増幅物は、既に固相と接合しているオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成するプローブの役割を果たす。ハイブリッド形成しない断片は、その後、除去される。前記オリゴヌクレオチドは、付録において指定された塩基配列のセグメントを逆相補する又はこれと同一である13ヌクレオチドの長さを有する少なくとも一つの塩基配列を含み、このセグメントは少なくとも一つのCpGジヌクレオチドを含む。CpGジヌクレオチドのシトシンは、13-merの5'末端からの五番目乃至九番目のヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドにはそれぞれCpGジヌクレオチドが存在する。前記PNA-オリゴマーは、付録において指定された塩基配列のセグメントを逆相補する又はこれと同一である9ヌクレオチドの長さを有する少なくとも一つの塩基配列を含み、このセグメントは少なくとも一つのCpGジヌクレオチドを含む。CpGジヌクレオチドのシトシンは、9-merの5'末端から見て四番目乃至六番目

40

50

のヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドにはそれぞれ C p G ジヌクレオチドが存在する。

【 0 0 4 2 】

この方法の第四のステップにおいて、ハイブリッド形成されない増幅物は除去される。

【 0 0 4 3 】

この方法の最終ステップにおいて、ハイブリッド形成した増幅物が検出される。この状況において、増幅物に添加された標識は、各オリゴヌクレオチド配列が位置する固相の各位値を特定可能であることが好適である。

【 0 0 4 4 】

本発明によれば、増幅物の標識は、蛍光標識、放射性核種、又は質量分析計において検出できる通常の質量を有する分離可能な分子断片であることが好適である。質量分析計は、増幅物、増幅物の断片、又は増幅物を相補するプローブの検出に好適であり、マトリックス支援レーザ脱離イオン化質量分析法 (MALDI) を用いて、或いは電子スプレー質量分析法 (ESI) を使用して、検出を実行及び視覚化することができる。

10

【 0 0 4 5 】

生成された断片は、質量分析計での検出可能性を高めるために、単一の正又は負の実効電荷を有することができる。上述の方法は、好ましくは、細胞周期に関連する遺伝子の遺伝的及び / 又はエピジェネティクスパラメータを確認するために使用される。

【 0 0 4 6 】

本発明によるオリゴマー又はそのアレイと、本発明によるキットとは、細胞周期に関連する遺伝子のメチル化パターンを分析することで、細胞周期に関連する疾患の診断及び / 又は治療に使用される。本発明によれば、この方法は、好ましくは、細胞周期に関連する遺伝子内の重要な遺伝的及び / 又はエピジェネティクスパラメータの診断及び / 又は治療に使用される。

20

【 0 0 4 7 】

本発明による方法は、例えば、HIV感染と、神経変性疾患と、移植片対宿主疾患と、老化と、系球体疾患と、レービ小体疾患と、関節炎と、動脈硬化と、充実性腫瘍と、癌との診断及び / 又は治療に使用される。配列 ID 番号 1 乃至配列 ID 番号 4 2 4 及びこれらの相補配列及び / 又は表 1 記載の遺伝子配列のうち一つに従った細胞周期に関連する遺伝子の化学的前処理された DNA の本発明による核酸は、細胞周期に関連する遺伝子の遺伝的及び / 又はエピジェネティクスパラメータの診断及び / 又は治療に使用することができる。

30

【 0 0 4 8 】

本発明は、更に、細胞周期に関連する遺伝子のメチル化パターンを分析することで細胞周期に関連する疾患の診断及び / 又は治療を行うための診断剤及び / 又は治療剤を製造する方法に関し、この診断剤及び / 又は治療剤は、その製造において、おそらくは適切な添加剤及び助剤と共に、本発明による少なくとも一つの核酸が使用される点によって特徴付けられる。

【 0 0 4 9 】

本発明の更なる主題は、細胞周期に関連する遺伝子のメチル化パターンを分析する細胞周期に関連する疾患の診断剤及び / 又は治療剤に関し、この診断剤及び / 又は治療剤は、おそらくは適切な添加剤及び助剤と共に、本発明による少なくとも一つの核酸が含まれる。

40

【 0 0 5 0 】

本発明は、更に、患者又は個人にとって不利な事象の診断及び / 又は予後診断に関し、これにおいて、細胞周期に関連する遺伝子内の重要な遺伝的及び / 又はエピジェネティクスパラメータは、本発明を用いて取得されるパラメータであり、遺伝的及び / 又はエピジェネティクスパラメータの他のセット (set) と比較することが可能であり、その格差は患者又は個人にとって不利な事象の診断及び / 又は予後診断の基準の役割を果たす。

【 0 0 5 1 】

本発明における、「ハイブリッド形成」という用語は、オリゴヌクレオチドを、試料 DNA において、ワトソン・クリック塩基対合のラインに沿って、完全に相補配列に接合し、

50

二重構造を形成することと理解される。「厳密なハイブリッド形成条件」は、60 の 2 . 5 × S S C 緩衝液でハイブリッド形成が実行され、その後、37 の低緩衝液濃度でのいくつかの洗浄ステップが行われ、安定状態が維持されとして理解される。

【0052】

「機能変異体」という用語は、DNA 配列を相補し、厳密な条件下で基準配列とハイブリッド形成を行い、本発明に従った対応するポリペプチドと類似する活性を有する、すべての DNA 配列を意味する。

【0053】

本発明における、「遺伝的パラメータ」は、細胞周期及びその調整に更に必要な配列に関連する遺伝子の変異及び多型現象である。変異として指定されるものは、特に、挿入と、
10 欠失と、点変異と、反転及び多型現象と、特に好適なものとして SNP (単一ヌクレオチド多型) とである。

【0054】

本発明における、「エピジェネティクスパラメータ」は、細胞周期及びその調整に更に必要な配列に関連する遺伝子の DNA 塩基におけるシトシンメチル化及びその他の化学的修飾である。さらにエピジェネティクスパラメータには、例えば、ヒストンのアセチル化が含まれ、しかしながら、これは説明した方法を使用して直接的に分析することはできないが、同様に、DNA メチル化と相関する。

【発明の実施の形態】

【0055】

以下では、本発明について、配列及び例と、添付の図とに基づいて、これに限定されることなく、詳細に説明する。

以下の例は、細胞周期に関連する遺伝子の断片に関係し、この例では、CDK4 において、特定の CG 位置がメチル化状態に関して分析される。

【実施例 1】

【0056】

細胞周期に関連する CDK4 遺伝子におけるメチル化分析

以下の実施例は、シトシン依存性キナーゼ 4 (CDK4) 遺伝子の断片に関係し、メチル化に関して特定の CG 位置が分析される。

【0057】

第一のステップにおいて、ゲノム配列は、塩基の 5 位置においてメチル化していないすべてのシトシンが修飾され、それは 5 位置においてメチル化しているシトシンが変化しないまま、異なる塩基が塩基対合行動に関して置換されるように、重亜硫酸塩 (亜硫酸水素塩、二亜硫酸塩) を使用して処理される。

【0058】

重亜硫酸 (bisulfite) 溶液が反応に使用される場合、非メチル化シトシン塩基において付加が発生する。更に、変性剤又は溶剤と、ラジカルインタセプターとが存在する。その後のアルカリ加水分解により、非メチル化シトシン核酸塩基のウラシルへの転換が生じる。化学的に転換された DNA は、次に、メチル化シトシンの検出に使用される。

第二の方法ステップにおいて、処理された DNA 試料は、水又は水溶液により希釈される。
40 好ましくは、この DNA は、その後、アルカリ性 pH 値で脱スルホン化される (10 乃至 30 分、90 乃至 100)。この方法の第三のステップにおいて、この DNA 試料は、好ましくは耐熱性 DNA ポリメラーゼを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応において増幅される。この例では、CDK4 遺伝子のシトシンが分析される。このため、474 bp の長さを有する定められた断片は、特定のプライマーオリゴヌクレオチド A A A A A T A A C A C A A T A A C T C A (配列 ID 番号 425) 及び T T T T G G T A G T T G G T T A T A T G (配列 ID 番号 426) により増幅される。この増幅物は、既に固相に接合されているオリゴヌクレオチドと (これは例えば G G G T T G G C G T G A G G T A (配列 ID 番号 427))、ハイブリッド形成し、二重構造を形成し、増幅物の位置 179 に位置するシトシンを検出する試料としての役割を果たす。ハイブリッド形成物の検出は、増
50

10

20

30

40

50

幅に使用されたC y 3及びC y 5蛍光標識プライマーオリゴヌクレオチドに基づく。増幅DNAのオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成反応は、重亜硫酸塩処理されたDNAのこの位置にメチル化シトシンが存在している場合のみ発生する。したがって、分析される特定のシトシンのメチル化状態は、ハイブリッド形成物から推測できる。

【0059】

特定の位置のメチル化状態を検証するために、増幅物の試料は、既に固相に接合された別のオリゴヌクレオチドと更にハイブリッド形成される。前記オリゴヌクレオチドは、焦点となる位置を除き、試料のメチル化状態を分析するのに以前使用されたオリゴヌクレオチドと同一である。分析される位置において、前記オリゴヌクレオチドは、シトシン塩基ではなくチミン塩基を含み、これは例えば、GGGT TGGTG TGA GGT A (配列ID番号428)である。そのため、ハイブリッド形成反応は、分析される位置に非メチル化シトシンが存在する場合のみ発生する。

10

【0060】

分析は、二種類の組織試料に関して実行され、試料1は健康な脳組織からのものであり、試料2は毛様細胞性星状細胞種(脳腫瘍)組織からのものである。結果(図1)から、試料1は増幅物の位置156においてメチル化していないのに対して、対照的に、試料2は同じ位置に高頻度のメチル化を有することが確認できる。

【実施例2】

【0061】

細胞周期に関連する疾患の診断

20

メチル化パターンを細胞周期に関連する疾患の一つに関係付けるために、最初に、疾患のある患者グループと健康な患者グループのDNAメチル化パターンを分析する必要がある。こうした分析は、例えば、例1と同じように実行される。このようにして得られた結果は、データベースに保存され、二グループ間でメチル化が異なるCpGジヌクレオチドが特定される。これは、個別のCpGメチル化割合を決定することで実行可能であり、こうした決定は、例えば、配列決定による比較的正確な方法、或いは、メチル化感受性「プライマー延長反応」による非常に正確な方法で行うことができる。更に、例えば、コンピュータ等により実行することが可能なクラスター分析により、全体のメチル化状態を同時に分析すること、及びパターンを比較することも可能である。

【0062】

30

その後、検査した患者を特定の治療グループに割り当て、こうした患者を個別化した治療により選択的に治療することが可能である。

【0063】

例2は、例えば、以下の疾患に関して実行することができる。

HIV感染、神経変性疾患、移植片対宿主疾患、老化、糸球体疾患、レービ小体疾患、関節炎、動脈硬化、充実性腫瘍、及び癌。

【0064】

表1 細胞周期に関する本発明の特に好適な遺伝子の一覧

遺伝子	データベースエントリー番号
	(GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov)
CCNB1	(M25753)
CCNE1	(M73812) ; (M74093)
DENR	(O43583)
EPHA5	(L36644)

MCM4	(X 7 4 7 9 4)
NEK 3	(Z 2 9 0 6 7)
PCTK 3	(X 6 6 3 6 2)
PRKAR1B	(M 6 5 0 6 6)
PRKCG	(M 1 3 9 7 7) ; (Z 1 5 1 1 4)
PRKM3	(M 8 4 4 9 0) ; (Z 1 1 6 9 6)
PRKMK 2	(L 1 1 2 8 5)
ZAP 7 0	(L 0 5 1 4 8)
ACP 1	(NM__0 0 4 3 0 0)
AKT 1	(NM__0 0 5 1 6 3)
BMPR 2	(NM__0 0 1 2 0 4)
DDR 1	(NM__0 1 3 9 9 3)
CCND 3	(NM__0 0 1 7 6 0)
CHES 1	(NM__0 0 5 1 9 7)
CLK 3	(NM__0 0 3 9 9 2)
DYRK 1	(NM__0 0 1 3 9 6)
EFNA 1	(NM__0 0 4 4 2 8)
IFIT 1	(NM__0 0 1 5 4 8)
SCYB 1 0	(NM__0 0 1 5 6 5)
INPP 5 D	(NM__0 0 5 5 4 1)
ISG 2 0	(NM__0 0 2 2 0 1)
LY 6 E	(NM__0 0 2 3 4 6)
PCNA	(NM__0 0 2 5 9 2)
PIK3CA	(NM__0 0 6 2 1 8)
PPP 1 R 3	(NM__0 0 2 7 1 1)
PTPN 7	(NM__0 0 2 8 3 2)
PTPN 9	(NM__0 0 2 8 3 3)
RHOK	(NM__0 0 2 9 2 9)
RYK	(NM__0 0 2 9 5 8)

10

20

30

40

EPHB3	(NM_004443)
PPP3CA	(NM_000944)
PRKCA	(NM_002737)
PRKG1	(NM_006258)
MAPK10	(NM_002753)
MAPK6	(NM_002748)
PTPRC	(NM_002838)
PTPRD	(NM_002839)
PTPRG	(NM_002841)
RBL1	(NM_002895)
STK3	(NM_006281)
TGFB1	(NM_000358)

10

20

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、蛍光標識増幅物による表面固定オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成を示している。試料Ⅰは、健康な脳組織からのものであり、試料Ⅱは、毛様細胞性星状細胞種悪性度Ⅱ（脳腫瘍）組織からのものである。点の蛍光は、増幅物によるオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成を示している。CGオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成は、分析されるシトシン位置でのメチル化を意味し、TGオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成は、分析されるシトシン位置での非メチル化を意味する。試料Ⅰは、増幅物の位置156においてメチル化していないが、一方、試料Ⅱは、同じ位置において高頻度のメチル化を有することを確認できる。

30

【配列の説明】

配列ⅠD番号1乃至424

配列ⅠD番号1乃至424は、細胞周期に関連する様々な遺伝子の化学的前処理されたゲノムDNAの配列を示している。特に、奇数の配列番号（配列ⅠD番号1、3、5、...）を有する配列は、いずれの場合にも、細胞周期に関連する様々な遺伝子の化学的前処理されたゲノムDNAの配列を示す。偶数の配列番号（配列ⅠD番号2、4、6、...）を有する配列は、いずれの場合にも、先行する配列を相補する細胞周期に関連する様々な遺伝子の化学的前処理されたゲノムDNAの配列を示す（例えば、配列ⅠD番号1に対する相補配列は配列ⅠD番号2であり、配列ⅠD番号3に対する補完配列は配列ⅠD番号4である）。

40

配列ⅠD番号425乃至配列ⅠD番号428は、例1において使用される特定のオリゴヌクレオチド配列を示す。

【図 1】

CG

TG

CG

TG



I



II

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 September 2001 (20.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/68911 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
(21) International Application Number: PCT/EP01/02945
(22) International Filing Date: 15 March 2001 (15.03.2001)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data:
100 11 847 0 15 March 2000 (15.03.2000) DE
100 19 058 8 6 April 2000 (06.04.2000) DE
100 19 173 8 7 April 2000 (07.04.2000) DE
100 32 529 7 30 June 2000 (30.06.2000) DE
100 43 826 1 1 September 2000 (01.09.2000) DE
(71) Applicant (for all designated States except US): EPIGENOMICS AG (DE/DI); Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).
(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): OLEK, Alexander (DE/DE); Schödenstrasse 13/2, 10115 Berlin (DE);
PUFFENBROCK, Christian (DE/DE); Schwarzkopffstrasse 7b, 10115 Berlin (DE); BERLIN, Kurt (DE/DE); Marienkirchweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).
(74) Agents: SCHÖTTE, Stefan et al.; Boehmert & Boehmert, Franz-Joseph-Strasse 38, 80801 München (DE).
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, 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, MY, NZ, NI, 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) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report.
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: DIAGNOSIS OF DISEASES ASSOCIATED WITH THE CELL CYCLE

CG TG



I

CG TG



II

(57) Abstract: The present invention relates to the chemically modified genomic sequences of genes associated with cell cycle, to oligonucleotides and/or PNA-oligonucleotides for detecting the cytosine methylation state of genes associated with cell cycle which are directed against the sequence, as well as to a method for ascertaining genetic and/or epigenetic parameters of genes associated with cell cycle.

WO 01/68911 A2

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

1

Diagnosis of Diseases Associated with the cell cycle**Field of the Invention**

The levels of observation that have been well studied by the methodological developments of recent years in molecular biology, are the genes themselves, the translation of these genes into RNA, and the resulting proteins. The question of which gene is switched on at which point in the course of the development of an individual, and how the activation and inhibition of specific genes in specific cells and tissues are controlled is correlatable to the degree and character of the methylation of the genes or of the genome. In this respect, pathogenic conditions may manifest themselves in a changed methylation pattern of individual genes or of the genome.

The present invention relates to nucleic acids, oligonucleotides, PNA-oligomers and to a method for the diagnosis and/or therapy of diseases which have a connection with the genetic and/or epigenetic parameters of genes associated with cell cycle and, in particular, with the methylation status thereof.

Prior Art

The cell cycle is the series of events between each mitotic division, culminating in the division of a cell into two daughter cells. The cycle consists of 4 discrete phases, the G1, S, G2 and M phases. Nuclear and cytoplasmic division occur during the M (mitotic) phase and DNA replication takes place during the S phase. The period between the end of the M phase and the start of the S phase is termed G1, and the phase between the end of the S phase and the start of the M phase is termed G2.

The regulation of these phases and the progression from one phase to the next is a key factor in the regulation of ordered cell division. The unidirectional progression from one phase to the next is controlled at various biochemical 'checkpoints'. These 'checkpoints', or biochemical pathways are of considerable interest, as alterations within them may result in decreased fidelity of events associated with cell cycle, such as chromosome duplication and segregation.

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

2

In mammalian cells G1 represents the most important checkpoint. At this point, the cell commits itself to DNA replication and regulates proliferation. Other checkpoints are present during the S phase when the integrity of the replicated chromosomes is checked and G2 when commitment to meiotic division is made. If the cell does not divide at this point, it remains in the condition of having twice the normal complement of chromosomes.

The regulatory system consists of a series of enzymes that respond to external signals and checkpoints by phosphorylating or dephosphorylating the next member of the pathway. Phosphorylation is catalysed by cyclin dependant kinases. These holoenzymes consist of two protein subunits: a regulatory subunit (the cyclin), and an associated catalytic subunit (the cyclin-dependent kinase or CDK). They are subject to many levels of regulation, and are used both to control the activities of the regulatory circuit itself and to control the activities of the substrates that execute the decisions of the regulatory circuit. In general, different types of cyclins are designated by letters (e.g., cyclin A, cyclin B, etc.) and CDKs are distinguished by numbers (CDK1, CDK2, etc.). The role of cell cycle regulators has been reviewed by Stephen Elledge, "Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis" *Science*, 274; 1664-1672 (1996).

Misregulation of the the cell cycle can lead to proliferation, and cell cycle regulators have been implicated in a number of diseases, in particular tumor formation. Examples of diseases involving disruptions in cell cycle pathways include:

1. HIV infection; Zhou and Ratner "Phosphorylation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Regulates Cell Cycle Arrest" *Journal of Virology*, Vol. 74; 6520-6527. (2000).
2. Alzheimers; Bruckner et al. "Aberrancies in signal transduction and cell cycle related events in Alzheimer's disease." *J Neural Transm Suppl*;54:147-58 (1998)
3. Graft-versus-host disease; Roussiotis *et. al.* "Altered T-cell receptor - CD28-mediated signaling and blocked cell cycle progression in interleukin 10 and transforming growth factor-beta-treated alloreactive T cells that do not induce graft-versus-host disease." *Blood*, ;97(2):565-571 (2001)

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

3

4. Aging; Zhu *et al.* "Neuronal CDK7 in hippocampus is related to aging and alzheimer disease" *Neurobiol Aging*. ;21(6):807-13 (2000)
5. Glomerular disease; Shankland *et al.* "Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in human glomerular disease: role in podocyte proliferation and maturation." *Kidney Int.*;58(2):674-83 (2000)
6. Lewy body disease; Takahashi *et al.* "Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) associated with Lewy bodies in diffuse Lewy body disease." *Brain Res.* 17;862(1-2):253-6 (2000)
7. Arthritis; Kohsaka *et al.* "Treatment of arthritis with cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a gene" *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* ;22(6):397-9 (1999)
8. Neurodegenerative disorders; Patrick *et al.* "Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration" *Nature* 9;402(6762):615-22 (1999)
9. Arteriosclerosis; Ihling *et al.* "Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions." *J Pathol*;185(3):303-12 (1998)
10. Ataxia telangiectasia; Matsuoka *et al.* "Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase" *Science*, Vol. 282; 1893-1897 (1998).
11. Bladder cancer; Del Pizzo *et al.* "Loss of Cell Cycle Regulators p27Kip1 and Cyclin E in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder Correlates with Tumor Grade and Patient Survival" *American Journal of Pathology*, Vol. 155; 1129-1136 (1999).
12. Leukemia; Vrhovac *et al.* "Prognostic Significance of the Cell Cycle Inhibitor p27Kip1 in Chronic B-Cell Lymphocytic Leukemia" *Blood* Vol. 91; 4694-4700 (1998).

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

4

13. Colorectal cancer; Thomas G.V. "Down-Regulation of p27 Is Associated with Development of Colorectal Adenocarcinoma Metastases" *American Journal of Pathology*;153; 681-687 (1998).
14. Gastric cancer; Takani Y "Cyclin D2 Overexpression and Lack of p27 Correlate Positively and Cyclin E Inversely with a Poor Prognosis in Gastric Cancer Cases" *American Journal of Pathology*;156; 585-594 (2000).
15. Liver cancer; Albrecht J "Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in the liver: role of nuclear localisation and p27 sequestration" Vol. 277;1207-G1216, (1999).
16. Lung cancer; Nabeyrat E "Retinoic acid-induced proliferation of lung alveolar epithelial cells is linked to p21CIP1 downregulation" Vol. 278;42-L50, (2000).
17. Prostate cancer; De Marzo A "Expression of the Cell Cycle Inhibitor p27Kip1 in, normal, Hyperplastic, and Neoplastic Cells" *American Journal of Pathology*;153;911-919 (1998).

The methylation of DNA is a necessary factor in the correct regulation of gene expression. For example, the p16 protein halts cell cycle progression at the G1/S boundary, and the loss of p16 function may lead to cancer progression by allowing unregulated cellular proliferation. Hypermethylation mediated inactivation of the p16 gene has been demonstrated in brain, breast, colon, head and neck, and non-small-cell lung cancer and in high grade non-Hodgkin's lymphoma. Other studies establishing a link between methylation and gene regulation include, Jackson *et al.* "Loss of genomic methylation causes p53 dependant apoptosis and epigenetic deregulation" *Nature Genetics* 27;31-39 (2001), which showed aberrant expression patterns of several key cell cycle genes.

The identification of the methylation dependant regulation of cell cycle genes opens up the possibility of developing alternative methods of cancer treatment and diagnosis. Treatment with DNA methylation inhibitors has been shown to restore gene expression of the key cell cycle gene p16, Bender *et al.* "Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines." *Cancer research* 58; 95-101 (1998). This

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

5

resulted in heritable levels of gene expression leading to suppression of growth in tumor cell lines.

Methylation based therapies could have considerable advantages over current methods of treatment, such as chemotherapy, surgery and radiotherapy. They may even provide a means of treating tumors which are resistant to conventional methods of therapy, as demonstrated by Soengas *et al* "Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma" Nature 409; 207-211(2001). In addition to the development of methylation specific therapies, experiments with *Mfin* mice have shown that inhibition of DNA methylation can suppress tumor initiation, Laird *et. al.* 'Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation' Cell 81: 197-205 (1995). Furthermore, DNA methylation analysis may provide novel means for cancer diagnosis.

5-methylcytosine is the most frequent covalent base modification in the DNA of eukaryotic cells. It plays a role, for example, in the regulation of the transcription, in genetic imprinting, and in tumorigenesis. Therefore, the identification of 5-methylcytosine as a component of genetic information is of considerable interest. However, 5-methylcytosine positions cannot be identified by sequencing since 5-methylcytosine has the same base pairing behavior as cytosine. Moreover, the epigenetic information carried by 5-methylcytosine is completely lost during PCR amplification.

A relatively new and currently the most frequently used method for analyzing DNA for 5-methylcytosine is based upon the specific reaction of bisulfite with cytosine which, upon subsequent alkaline hydrolysis, is converted to uracil which corresponds to thymidine in its base pairing behavior. However, 5-methylcytosine remains unmodified under these conditions. Consequently, the original DNA is converted in such a manner that methylcytosine, which originally could not be distinguished from cytosine by its hybridization behavior, can now be detected as the only remaining cytosine using "normal" molecular biological techniques, for example, by amplification and hybridization or sequencing. All of these techniques are based on base pairing which can now be fully exploited. In terms of sensitivity, the prior art is defined by a method which encloses the DNA to be analyzed in an agarose matrix, thus preventing the diffusion and renaturation of the DNA (bisulfite only reacts with single-stranded DNA), and which replaces all precipitation and purification steps with fast dialysis (Olek A,

WO 01/58911

PCT/EP01/02945

6

Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 1996 Dec 15;24(24):5064-6). Using this method, it is possible to analyze individual cells, which illustrates the potential of the method. However, currently only individual regions of a length of up to approximately 3000 base pairs are analyzed, a global analysis of cells for thousands of possible methylation events is not possible. However, this method cannot reliably analyze very small fragments from small sample quantities either. These are lost through the matrix in spite of the diffusion protection.

An overview of the further known methods of detecting 5-methylcytosine may be gathered from the following review article: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 2255.

To date, barring few exceptions (e.g., Zeschnick M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet.* 1997 Mar-Apr;5(2):94-8) the bisulfite technique is only used in research. Always, however, short, specific fragments of a known gene are amplified subsequent to a bisulfite treatment and either completely sequenced (Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet.* 1997 Nov;17(3):275-6) or individual cytosine positions are detected by a primer extension reaction (Gonzalvo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15;25(12):2529-31, WO Application 95/00669) or by enzymatic digestion (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15;25(12):2532-4). In addition, detection by hybridization has also been described (Olek et al., WO 99/28498).

Further publications dealing with the use of the bisulfite technique for methylation detection in individual genes are: Grigg G, Clark S. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioessays.* 1994 Jun;16(6):431-6, 431; Zeschnick M, Schmitz B, Ditttrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet.* 1997 Mar;6(3):387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

7

bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1994 Feb 25;22(4):695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene.* 1995 May 19;157(1-2):261-4; WO 97 46705, WO 95 15373 and WO 45560.

An overview of the Prior Art in oligomer array manufacturing can be gathered from a special edition of *Nature Genetics* (*Nature Genetics Supplement*, Volume 21, January 1999), published in January 1999, and from the literature cited therein.

Fluorescently labeled probes are often used for the scanning of immobilized DNA arrays. The simple attachment of Cy3 and Cy5 dyes to the 5'-OH of the specific probe are particularly suitable for fluorescence labels. The detection of the fluorescence of the hybridized probes may be carried out, for example via a confocal microscope. Cy3 and Cy5 dyes, besides many others, are commercially available.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF) is a very efficient development for the analysis of biomolecules (Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988 Oct 15;60(20):2299-301). An analyte is embedded in a light-absorbing matrix. The matrix is evaporated by a short laser pulse thus transporting the analyte molecule into the vapor phase in an unfragmented manner. The analyte is ionized by collisions with matrix molecules. An applied voltage accelerates the ions into a field-free flight tube. Due to their different masses, the ions are accelerated at different rates. Smaller ions reach the detector sooner than bigger ones.

MALDI-TOF spectrometry is excellently suited to the analysis of peptides and proteins. The analysis of nucleic acids is somewhat more difficult (Cut I G, Beck S. DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Current Innovations and Future Trends.* 1995, 1; 147-57). The sensitivity to nucleic acids is approximately 100 times worse than to peptides and decreases disproportionally with increasing fragment size. For nucleic acids having a multiply negatively charged backbone, the ionization process via the matrix is considerably less efficient. In MALDI-TOF spectrometry, the selection of the matrix plays an

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

8

eminently important role. For the desorption of peptides, several very efficient matrixes have been found which produce a very fine crystallization. There are now several responsive matrixes for DNA, however, the difference in sensitivity has not been reduced. The difference in sensitivity can be reduced by chemically modifying the DNA in such a manner that it becomes more similar to a peptide. Phosphorothioate nucleic acids in which the usual phosphates of the backbone are substituted with thiophosphates can be converted into a charge-neutral DNA using simple alkylation chemistry (Gut IG, Beck S. A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* 1995 Apr 25;23(8):1367-73). The coupling of a charge tag to this modified DNA results in an increase in sensitivity to the same level as that found for peptides. A further advantage of charge tagging is the increased stability of the analysis against impurities which make the detection of unmodified substrates considerably more difficult.

Genomic DNA is obtained from DNA of cell, tissue or other test samples using standard methods. This standard methodology is found in references such as Fritsch and Maniatis eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989.

Object of the invention

In view of the above, it is the object of the present invention to provide the chemically modified DNA of genes associated with the cell cycle, as well as oligonucleotides and/or PNA-oligomers for detecting cytosine methylations, as well as a method which is particularly suitable for the diagnosis and/or therapy of genetic and epigenetic parameters of genes associated with the cell cycle. The present invention is based on the discovery that genetic and epigenetic parameters and, in particular, the cytosine methylation pattern of genes associated with cell cycle are particularly suitable for the diagnosis and/or therapy of diseases associated with the cell cycle.

This objective is achieved according to the present invention by providing a nucleic acid containing a sequence of at least 18 bases in length of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of Seq. ID No.1 through Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto and/or of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of the sequences of the genes listed in table 1. In the

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

9

table, after the listed gene designations, the respective data bank numbers (accession numbers) are specified which define the appertaining gene sequences as unique. GenBank at the National Institute of Health was used as the underlying data bank at the Internet-address www.ncbi.nlm.nih.gov.

The chemically modified nucleic acid could heretofore not be connected with the ascertainment of genetic and epigenetic parameters.

The object of the present invention is further achieved by an oligonucleotide or oligomer for detecting the cytosine methylation state in chemically pretreated DNA, containing at least one base sequence having a length of at least 13 nucleotides which hybridizes to a chemically pretreated DNA of genes associated with the cell cycle according to Seq. ID No.1 through Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto and/or of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of the sequences of the genes listed in table 1. The oligomer probes according to the present invention constitute important and effective tools which, for the first time, make it possible to ascertain the genetic and epigenetic parameters of genes associated with the cell cycle. The base sequence of the oligomers preferably contains at least one CpG dinucleotide. The probes may also exist in the form of a PNA (peptide nucleic acid) which has particularly preferred pairing properties. Particularly preferred are oligonucleotides according to the present invention in which the cytosine of the CpG dinucleotide is the 5th - 9th nucleotide from the 5'-end of the 13-mer; in the case of PNA-oligomers, it is preferred for the cytosine of the CpG dinucleotide to be the 4th - 6th nucleotide from the 5'-end of the 9-mer.

The oligomers according to the present invention are normally used in so called "sets" which contain at least one oligomer for each of the CpG dinucleotides of the sequences of Seq. ID No.1 through Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto and/or of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of the sequences of the genes listed in table 1. Preferred is a set which contains at least one oligomer for each of the CpG dinucleotides from one of Seq. ID No.1 through Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto and/or of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of the sequences of the genes listed in table 1.

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

10

Moreover, the present invention makes available a set of at least two oligonucleotides which can be used as so-called "primer oligonucleotides" for amplifying DNA sequences of one of Seq. ID No.1 through Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto and/or of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of the sequences of the genes listed in table 1, or segments thereof.

In the case of the sets of oligonucleotides according to the present invention, it is preferred that at least one oligonucleotide is bound to a solid phase.

The present invention moreover relates to a set of at least 10 n (oligonucleotides and/or PNA-oligomers) used for detecting the cytosine methylation state in chemically pretreated genomic DNA (Seq. ID No.1 through Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto and/or of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of the sequences of the genes listed in table 1). These probes enable diagnosis and/or therapy of genetic and epigenetic parameters of genes associated with the cell cycle. The set of oligomers may also be used for detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the chemically pretreated DNA of genes associated with the cell cycle according to one of Seq. ID No.1 through Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto and/or of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of the sequences of the genes listed in table 1.

According to the present invention, it is preferred that an arrangement of different oligonucleotides and/or PNA-oligomers (a so-called "array") made available by the present invention is present in a manner that it is likewise bound to a solid phase. This array of different oligonucleotide- and/or PNA-oligomer sequences can be characterized in that it is arranged on the solid phase in the form of a rectangular or hexagonal lattice. The solid phase surface is preferably composed of silicon, glass, polystyrene, aluminum, steel, iron, copper, nickel, silver, or gold. However, nitrocellulose as well as plastics such as nylon which can exist in the form of pellets or also as resin matrices are possible as well.

Therefore, a further subject matter of the present invention is a method for manufacturing an array fixed to a carrier material for analysis in connection with diseases associated with the

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

11

cell cycle in which method at least one oligomer according to the present invention is coupled to a solid phase. Methods for manufacturing such arrays are known, for example, from US Patent 5,744,305 by means of solid-phase chemistry and photolabile protecting groups.

A further subject matter of the present invention relates to a DNA chip for the analysis of diseases associated with the cell cycle which contains at least one nucleic acid according to the present invention. DNA chips are known, for example, from US Patent 5,837,832.

Moreover, a subject matter of the present invention is a kit which may be composed, for example, of a bisulfite-containing reagent, a set of primer oligonucleotides containing at least two oligonucleotides whose sequences in each case correspond or are complementary to an 18 base long segment of the base sequences specified in the appendix (Seq. ID No.1 through Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto and/or of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of the sequences of the genes listed in table 1), oligonucleotides and/or PNA-oligomers as well as instructions for carrying out and evaluating the described method. However, a kit along the lines of the present invention can also contain only part of the aforementioned components.

The present invention also makes available a method for ascertaining genetic and/or epigenetic parameters of genes associated with the cycle cell by analyzing cytosine methylations and single nucleotide polymorphisms, including the following steps:

In the first step of the method, a genomic DNA sample is chemically treated in such a manner that cytosine bases which are unmethylated at the 5'-position are converted to uracil, thymine, or another base which is dissimilar to cytosine in terms of hybridization behavior. This will be understood as 'chemical pretreatment' hereinafter.

The genomic DNA to be analyzed is preferably obtained from usual sources of DNA such as cells or cell components, for example, cell lines, biopsies, blood, sputum, stool, urine, cerebral-spinal fluid, tissue embedded in paraffin such as tissue from eyes, intestine, kidney, brain, heart, prostate, lung, breast or liver, histologic object slides, or combinations thereof.

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

12

The above described treatment of genomic DNA is preferably carried out with bisulfite (hydrogen sulfite, disulfite) and subsequent alkaline hydrolysis which results in a conversion of non-methylated cytosine nucleobases to uracil or to another base which is dissimilar to cytosine in terms of base pairing behavior.

Fragments of the chemically pretreated DNA are amplified, using sets of primer oligonucleotides according to the present invention, and a, preferably heat-stable polymerase. Because of statistical and practical considerations, preferably more than ten different fragments having a length of 100 - 2000 base pairs are amplified. The amplification of several DNA segments can be carried out simultaneously in one and the same reaction vessel. Usually, the amplification is carried out by means of a polymerase chain reaction (PCR).

In a preferred embodiment of the method, the set of primer oligonucleotides includes at least two oligonucleotides whose sequences are each reverse complementary or identical to an at least 18 base-pair long segment of the base sequences specified in the appendix (Seq. ID No.1 through Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto and/or of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of the sequences of the genes listed in table 1). The primer oligonucleotides are preferably characterized in that they do not contain any CpG dinucleotides.

According to the present invention, it is preferred that at least one primer oligonucleotide is bonded to a solid phase during amplification. The different oligonucleotide and/or PNA-oligomer sequences can be arranged on a plane solid phase in the form of a rectangular or hexagonal lattice, the solid phase surface preferably being composed of silicon, glass, polystyrene, aluminum, steel, iron, copper, nickel, silver, or gold, it being possible for other materials such as nitrocellulose or plastics to be used as well.

The fragments obtained by means of the amplification can carry a directly or indirectly detectable label. Preferred are labels in the form of fluorescence labels, radionuclides, or detachable molecule fragments having a typical mass which can be detected in a mass spectrometer, it being preferred that the fragments that are produced have a single positive or negative net charge for better detectability in the mass spectrometer. The detection may be carried out and

visualized by means of matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI) or using electron spray mass spectrometry (ESI).

The amplicates obtained in the second step of the method are subsequently hybridized to an array or a set of oligonucleotides and/or PNA probes. In this context, the hybridization takes place in the manner described in the following. The set of probes used during the hybridization is preferably composed of at least 10 oligonucleotides or PNA-oligomers. In the process, the amplicates serve as probes which hybridize to oligonucleotides previously bonded to a solid phase. The non-hybridized fragments are subsequently removed. Said oligonucleotides contain at least one base sequence having a length of 13 nucleotides which is reverse complementary or identical to a segment of the base sequences specified in the appendix, the segment containing at least one CpG dinucleotide. The cytosine of the CpG dinucleotide is the 5th to 9th nucleotide from the 5'-end of the 13-mer. One oligonucleotide exists for each CpG dinucleotide. Said PNA-oligomers contain at least one base sequence having a length of 9 nucleotides which is reverse complementary or identical to a segment of the base sequences specified in the appendix, the segment containing at least one CpG dinucleotide. The cytosine of the CpG dinucleotide is the 4th to 6th nucleotide seen from the 5'-end of the 9-mer. One oligonucleotide exists for each CpG dinucleotide.

In the fourth step of the method, the non-hybridized amplicates are removed.

In the final step of the method, the hybridized amplicates are detected. In this context, it is preferred that labels attached to the amplicates are identifiable at each position of the solid phase at which an oligonucleotide sequence is located.

According to the present invention, it is preferred that the labels of the amplicates are fluorescence labels, radionuclides, or detachable molecule fragments having a typical mass which can be detected in a mass spectrometer. The mass spectrometer is preferred for the detection of the amplicates, fragments of the amplicates or of probes which are complementary to the amplicates, it being possible for the detection to be carried out and visualized by means of matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI) or using electron spray mass spectrometry (ESI).

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

14

The produced fragments may have a single positive or negative net charge for better detectability in the mass spectrometer. The aforementioned method is preferably used for ascertaining genetic and/or epigenetic parameters of genes associated with the cell cycle.

The oligomers according to the present invention or arrays thereof as well as a kit according to the present invention are intended to be used for the diagnosis and/or therapy of diseases associated with the cell cycle by analyzing methylation patterns of genes associated with the cell cycle. According to the present invention, the method is preferably used for the diagnosis and/or therapy of important genetic and/or epigenetic parameters within genes associated with cell cycle.

The method according to the present invention is used, for example, for the diagnosis and/or therapy of HIV infection, neurodegenerative disorders, graft-versus-host disease, aging, glomerular disease, Lewy body disease, arthritis, arteriosclerosis, solid tumors and cancers.

The nucleic acids according to the present invention of Seq. ID No.1 through Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto and/or of the chemically pretreated DNA of genes associated with cell cycle according to one of the sequences of the genes listed in table 1 can be used for the diagnosis and/or therapy of genetic and/or epigenetic parameters of genes associated with the cell cycle.

The present invention moreover relates to a method for manufacturing a diagnostic agent and/or therapeutic agent for the diagnosis and/or therapy of diseases associated with the cell cycle by analyzing methylation patterns of genes associated with the cell cycle, the diagnostic agent and/or therapeutic agent being characterized in that at least one nucleic acid according to the present invention is used for manufacturing it, possibly together with suitable additives and auxiliary agents.

A further subject matter of the present invention relates to a diagnostic agent and/or therapeutic agent for diseases associated with the cell cycle by analyzing methylation patterns of genes associated with the cell cycle, the diagnostic agent and/or therapeutic agent containing at least one nucleic acid according to the present invention, possibly together with suitable additives and auxiliary agents.

The present invention moreover relates to the diagnosis and/or prognosis of events which are disadvantageous to patients or individuals in which important genetic and/or epigenetic parameters within genes associated with the cell cycle said parameters obtained by means of the present invention may be compared to another set of genetic and/or epigenetic parameters, the differences serving as the basis for a diagnosis and/or prognosis of events which are disadvantageous to patients or individuals.

In the context of the present invention the term "hybridization" is to be understood as a bond of an oligonucleotide to a completely complementary sequence along the lines of the Watson-Crick base pairings in the sample DNA, forming a duplex structure. To be understood by "stringent hybridization conditions" are those conditions in which a hybridization is carried out at 60°C in 2.5 x SSC buffer, followed by several washing steps at 37°C in a low buffer concentration, and remains stable.

The term "functional variants" denotes all DNA sequences which are complementary to a DNA sequence, and which hybridize to the reference sequence under stringent conditions and have an activity similar to the corresponding polypeptide according to the present invention.

In the context of the present invention, "genetic parameters" are mutations and polymorphisms of genes associated with cell cycle and sequences further required for their regulation. To be designated as mutations are, in particular, insertions, deletions, point mutations, inversions and polymorphisms and, particularly preferred, SNPs (single nucleotide polymorphisms).

In the context of the present invention, "epigenetic parameters" are, in particular, cytosine methylations and further chemical modifications of DNA bases of genes associated with the cell cycle and sequences further required for their regulation. Further epigenetic parameters include, for example, the acetylation of histones which, however, cannot be directly analyzed using the described method but which, in turn, correlates with the DNA methylation.

In the following, the present invention will be explained in greater detail on the basis of the sequences and examples and the accompanying figure without being limited thereto.

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

16

Figure 1

Figure 1 shows the hybridisation of fluorescent labelled amplicates to a surface bound oligonucleotide. Sample I being from healthy brain tissue and sample II being from pilocytic astrocytoma grade II (brain tumor) tissue. Fluorescence at a spot shows hybridisation of the amplicate to the oligonucleotide. Hybridisation to a CG oligonucleotide denotes methylation at the cytosine position being analysed, hybridisation to a TG oligonucleotide denotes no methylation at the cytosine position being analysed. It can be seen that Sample I was unmethylated at position 156 of the amplicate whereas in comparison Sample II had a higher degree of methylation at the same position.

Sequence ID Nos. 1 to 424

Sequence ID Nos. 1 to 424 show sequences of the chemically pretreated genomic DNAs of different genes associated with cell cycle. In particular, sequences having odd sequence numbers (e.g., Seq. ID No. 1, 3, 5, ...) exhibit in each case sequences of the chemically pretreated genomic DNAs of different genes associated with cell cycle. Sequences having even sequence numbers (e.g., Seq. ID No. 2, 4, 6, ...) exhibit in each case the sequences of the chemically pretreated genomic DNAs of genes associated with cell cycle which are complementary to the preceding sequences (e.g., the complementary sequence to Seq. ID No.1 is Seq. ID No.2, the complementary sequence to Seq. ID No.3 is Seq. ID No.4, etc.)

Seq. ID No. 425 to Seq. ID No. 428 show specific oligonucleotide sequences as used in Example 1.

The following example relates to a fragment of a gene associated with cell cycle, in this case, CDK4 in which a specific CG-position is analyzed for its methylation status.

Example 1: Methylation analysis in the gene CDK4 associated with the cell cycle.

The following example relates to a fragment of the gene cytosine dependant kinase 4 (CDK4) in which a specific CG-position is to be analyzed for methylation.

In the first step, a genomic sequence is treated using bisulfite (hydrogen sulfite, disulfite) in such a manner that all cytosines which are not methylated at the 5-position of the base are

modified in such a manner that a different base is substituted with regard to the base pairing behavior while the cytosines methylated at the 5-position remain unchanged.

If bisulfite solution is used for the reaction, then an addition takes place at the non-methylated cytosine bases. Moreover, a denaturing reagent or solvent as well as a radical interceptor is present. A subsequent alkaline hydrolysis then gives rise to the conversion of non-methylated cytosine nucleobases to uracil. Chemically converted DNA is then used for the detection of methylated cytosines. In the second method step, the treated DNA sample is diluted with water or an aqueous solution. Preferably, the DNA is subsequently desulfonated (10-30 min, 90-100 °C) at an alkaline pH value. In the third step of the method, the DNA sample is amplified in a polymerase chain reaction, preferably using a heat-resistant DNA polymerase. In the present case, cytosines of the gene CDK4 are analyzed. To this end, a defined fragment having a length of 474 bp is amplified with the specific primer oligonucleotides AAAAATAACACAATACTCA (Seq. ID No. 425) and TTTTGGTAGTTGGTTATATG (Seq. ID No. 426). This amplificate serves as a sample which hybridizes to an oligonucleotide previously bonded to a solid phase, forming a duplex structure, for example GGGTTGGCGTGAGGTA (Seq. ID No. 427), the cytosine to be detected being located at position 179 of the amplificate. The detection of the hybridization product is based on Cy3 and Cy5 fluorescently labeled primer oligonucleotides which have been used for the amplification. The hybridization reaction of the amplified DNA with the oligonucleotide takes place only if a methylated cytosine was present at this location in the bisulfite treated DNA. Thus, the methylation status of the specific cytosine to be analyzed may be inferred from the hybridization product.

In order to verify the methylation status of the position, a sample of the amplificate is further hybridized to another oligonucleotide previously bonded to a solid phase. Said oligonucleotide is identical to the oligonucleotide previously used to analyze the methylation status of the sample, with the exception of the position in question. At the position to be analysed said oligonucleotide comprises a thymine base as opposed to a cytosine base i.e. sequence GGGTTGGTGTGAGGTA (Seq. ID No. 428). Therefore, the hybridisation reaction only takes place if an unmethylated cytosine is present at the position to be analysed.

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

18

The analysis was carried out on two tissue samples, Sample 1 from healthy brain tissue, and Sample 2 from pilocytic astrocytoma (brain tumor) tissue. From the results (Figure 1) it can be seen that Sample 1 was unmethylated at position 156 of the amplicate whereas in comparison Sample 2 had a higher degree of methylation at the same position.

Example 2: Diagnosis of diseases associated with the cell cycle

In order to relate the methylation patterns to one of the diseases associated with the cell cycle, it is initially required to analyze the DNA methylation patterns of a group of diseased and of a group of healthy patients. These analyses are carried out, for example, analogously to example 1. The results obtained in this manner are stored in a database and the CpG dinucleotides which are methylated differently between the two groups are identified. This can be carried out by determining individual CpG methylation rates as can be done, for example, in a relatively imprecise manner, by sequencing or else, in a very precise manner, by a methylation-sensitive "primer extension reaction". It is also possible for the entire methylation status to be analyzed simultaneously, and for the patterns to be compared, for example, by clustering analyses which can be carried out, for example, by a computer.

Subsequently, it is possible to allocate the examined patients to a specific therapy group and to treat these patients selectively with an individualized therapy.

Example 2 can be carried out, for example, for the following diseases:

HIV infection, neurodegenerative disorders, graft-versus-host disease, aging, glomerular disease, Lewy body disease, arthritis, arterosclerosis, solid tumors and cancers.

Table 1

Listing of particularly preferred genes of the present invention associated with the cell cycle.

Gene	Database Entry No. (GenBank at www.ncbi.nlm.nih.gov)
CCNB1	(M25753)
CCNE1	(M73812); (M74093)
DENR	(O43583)
EPHA5	(L36644)
MCM4	(X74794)

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

19

NEK3	(Z29067)
PCTK3	(X66362)
PRKAR1B	(M65066)
PRKCG	(M13977); (Z15114)
PRKM3	(M84490); (Z11696)
PRKMK2	(L11285)
ZAP70	(L05148)
ACPI	(NM_004300)
AKT1	(NM_005163)
BMPR2	(NM_001204)
DDR1	(NM_013993)
CCND3	(NM_001760)
CHE3	(NM_005197)
CLK3	(NM_003992)
DYRK1	(NM_001396)
EFNA1	(NM_004428)
IFIT1	(NM_001548)
SCYB10	(NM_001565)
INPP5D	(NM_005541)
ISG20	(NM_002201)
LY6E	(NM_002346)
PCNA	(NM_002592)
PIK3CA	(NM_006218)
PPP1R3	(NM_002711)
PTPN7	(NM_002832)
PTPN9	(NM_002833)
RHOK	(NM_002929)
RYK	(NM_002958)
EPHB3	(NM_004443)
PPP3CA	(NM_000944)
PRKCA	(NM_002737)
PRKG1	(NM_006258)

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

20

MAPK10	(NM_002753)
MAPK6	(NM_002748)
PTPRC	(NM_002838)
PTPRD	(NM_002839)
PTPRG	(NM_002841)
RBL1	(NM_002895)
STK3	(NM_006281)
TGFB1	(NM_000358)

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

21

Claims

1. A nucleic acid comprising a sequence at least 18 bases in length of a segment of the chemically pretreated DNA of genes associated with the cell cycle according to one of the sequences taken from the group of Seq. ID No.1 to Seq. ID No.424 and sequences complementary thereto.

2. A nucleic acid comprising a sequence at least 18 bases in length of a segment of the chemically pretreated DNA of genes associated with the cell cycle according to one of the sequences according to the genes CCNB1 (M25753), CCNE1 (M73812) (M74093), DENR (O43583), EPHA5 (L36644), MCM4 (X74794), NEK3 (Z29067), PCTK3 (X66362), PRKAR1B (M65066), PRKCG (M13977) (Z15114), PRKM3 (M84490) (Z11696), PRKMK2 (L11285), ZAP70 (L05148), ACP1 (NM_004300), AKT1 (NM_005163), BMPR2 (NM_001204), DDR1 (NM_013993), CCND3 (NM_001760), CCNF (NM_001761), CHES1 (NM_005197), CLK3 (NM_003992), DYRK1 (NM_001396), EFNA1 (NM_004428), IFIT1 (NM_001548), SCYB10 (NM_001565), INPP5D (NM_005541), ISG20 (NM_002201), LY6E (NM_002346), PCNA (NM_002592), PIK3CA (NM_006218), PPP1R3 (NM_002711), PTPN7 (NM_002832), PTPN9 (NM_002833), RHOK (NM_002929), RYK (NM_002958), EPHB3 (NM_004443), PPP3CA (NM_000944), PRKCA (NM_002737), PRKG1 (NM_006258), MAPK10 (NM_002753), MAPK6 (NM_002748), PTPRC (NM_002838), PTPRD (NM_002839), PTPRG (NM_002841), RBL1 (NM_002895), STK3 (NM_006281), TGFBI (NM_000358), and sequences complementary thereto.

3. An oligomer, in particular an oligonucleotide or peptide nucleic acid (PNA)-oligomer, said oligomer comprising in each case at least one base sequence having a length of at least 9 nucleotides which hybridizes to or is identical to a chemically pretreated DNA of genes associated with the cell cycle according to one of the Seq. ID Nos 1 through 424 according to claim 1 or to a chemically pretreated DNA of genes according to claim 2, and sequences complementary thereto

4. The oligomer as recited in Claim 3; wherein the base sequence includes at least one CpG dinucleotide.

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

22

5. The oligomer as recited in Claim 4; characterized in that the cytosine of the CpG dinucleotide is located approximately in the middle third of the oligomer.

6. A set of oligomers, comprising at least two oligomers according to any of claims 3 to 5.

7. A set of oligomers as recited in Claim 6, comprising oligomers for detecting the methylation state of all CpG dinucleotides from one of the sequences according to the Seq. ID Nos 1 through 424 according to claim 1 or to a chemically pretreated DNA of genes according to claim 2, and sequences complementary thereto.

8. A set of at least two oligonucleotides as recited in Claim 3 which can be used as primer oligonucleotides for the amplification of DNA sequences of one of Seq. ID 1 through Seq. ID 424 and sequences complementary thereto and/or sequences of a chemically pretreated DNA of genes according to claim 2, and sequences complementary thereto, or segments thereof.

9. A set of oligonucleotides as recited in Claim 8, characterized in that at least one oligonucleotide is bound to a solid phase.

10. Use of a set of oligomer probes comprising at least ten of the oligomers according to any of Claims 6 through 9 for detecting the cytosine methylation state and/or single nucleotide polymorphisms (SNPs) in chemically pretreated genomic DNA according to claim 1 or a chemically pretreated DNA of genes according to claim 2.

11. A method for manufacturing an arrangement of different oligomers (array) fixed to a carrier material for analyzing diseases associated with the methylation state of the CpG dinucleotides of one of the Seq. ID 1 through Seq. ID 424 and sequences complementary thereto and/or a chemically pretreated DNA of genes according to claim 2, wherein at least one oligomer according to any of Claims 3 through 5 is coupled to a solid phase.

12. An arrangement of different oligomers (array), obtainable according to Claims 11.

13. An array of different oligonucleotide- and/or PNA-oligomer sequences as recited in Claim 12, characterized in that these are arranged on a plane solid phase in the form of a rectangular or hexagonal lattice.

14. The array as recited in any of Claims 12 or 13, characterized in that the solid phase surface is composed of silicon, glass, polystyrene, aluminum, steel, iron, copper, nickel, silver, or gold.

15. A DNA- and/or PNA-array for analyzing diseases associated with the methylation state of genes, comprising at least one nucleic acid according to one of the preceding claims.

16. A method for ascertaining genetic and/or epigenetic parameters for the diagnosis and/or therapy of existing diseases or the predisposition to specific diseases by analyzing cytosine methylations, characterized in that the following steps are carried out:

a) in a genomic DNA sample, cytosine bases which are unmethylated at the 5-position are converted, by chemical treatment, to uracil or another base which is dissimilar to cytosine in terms of hybridization behavior;

b) fragments of the chemically pretreated genomic DNA are amplified using sets of primer oligonucleotides according to Claim 8 or 9 and a polymerase, the amplicates carrying a detectable label;

c) Amplicates are hybridized to a set of oligonucleotides and/or PNA probes according to the Claims 6 or 7, or else to an array according to one of the Claims 12 through 15;

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

24

d) the hybridized amplicates are subsequently detected.

17. The method as recited in Claim 16, characterized in that the chemical treatment is carried out by means of a solution of a bisulfite, hydrogen sulfite or disulfite.

18. The method as recited in one of the Claims 16 or 17, characterized in that more than ten different fragments having a length of 100 - 2000 base pairs are amplified.

19. The method as recited in one of the Claims 16 through 18, characterized in that the amplification of several DNA segments is carried out in one reaction vessel.

20. The method as recited in one of the Claims 16 through 19, characterized in that the polymerase is a heat-resistant DNA polymerase.

21. The method as recited in Claim 20, characterized in that the amplification is carried out by means of the polymerase chain reaction (PCR).

22. The method as recited in one of the Claims 16 through 21, characterized in that the labels of the amplicates are fluorescence labels.

23. The method as recited in one of the Claims 16 through 21, characterized in that the labels of the amplicates are radionuclides.

24. The method as recited in one of the Claims 16 through 21, characterized in that the labels of the amplicates are detachable molecule fragments having a typical mass which are detected in a mass spectrometer.

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

25

25. The method as recited in one of the Claims 16 through 21, characterized in that the amplicates or fragments of the amplicates are detected in the mass spectrometer.

26. The method as recited in one of the Claims 24 and/or 25, characterized in that the produced fragments have a single positive or negative net charge for better detectability in the mass spectrometer

27. The method as recited in one of the Claims 24 through 26, characterized in that detection is carried out and visualized by means of matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI) or using electron spray mass spectrometry (ESI).

28. The method as recited in one of the Claims 16 through 27, characterized in that the genomic DNA is obtained from cells or cellular components which contain DNA, sources of DNA comprising, for example, cell lines, biopsies, blood, sputum, stool, urine, cerebral-spinal fluid, tissue embedded in paraffin such as tissue from eyes, intestine, kidney, brain, heart, prostate, lung, breast or liver, histologic object slides, and all possible combinations thereof.

29. A kit comprising a bisulfite (= disulfite, hydrogen sulfite) reagent as well as oligonucleotides and/or PNA-oligomers according to any of Claims 3 through 5.

30. The use of a nucleic acid according to Claims 1 or 2, of an oligonucleotide or PNA-oligomer according to one of the Claims 3 through 5, of a kit according to Claim 29, of an array according to one of the Claims 12 through 15, of a set of oligonucleotides according to one of Claims 6 through 9 for the diagnosis of HIV infection, neurodegenerative disorders, graft-versus-host disease, aging, glomerular disease, Lewy body disease, arthritis, arteriosclerosis, solid tumors and cancers.

31. The use of a nucleic acid according to Claim 1 or 2, of an oligonucleotide or PNA-oligomer according to one of Claims 3 through 5, of a kit according to Claim 29, of an array

WD 01/68911

PCT/EP01/02945

26

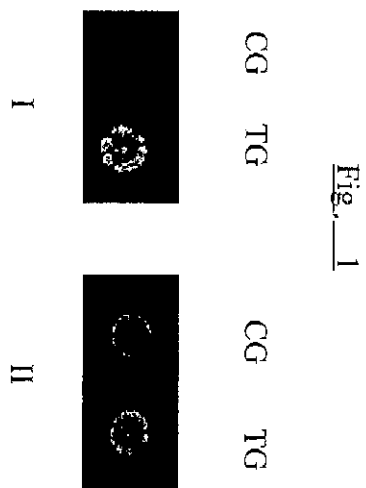
according to one of the Claims 12 through 15, of a set of oligonucleotides according to one of Claims 6 through 9 for the therapy of HIV infection, neurodegenerative disorders, graft-versus-host disease, aging, glomerular disease, Lewy body disease, arthritis, arterosclerosis, solid tumors and cancers.

32. A kit, comprising a bisulfite (= disulfite, hydrogen sulfite) reagent as well as oligonucleotides and/or PNA-oligomers according to one of Claims 3 through 5.

WO 01/68911

PCT/EP01/02945

1/1



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 September 2001 (20.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/068911 A2(51) International Patent Classification: C12Q 1/68
G01N 33/50, B011 39/00, C12N 5/511, A61K 31/70(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): OLFK, Alexander (DE/DE); Schröderstrasse 13/2, 10115 Berlin (DE);
PIEPENBROCK, Christian (DE/DE); Schwarzkopfs-
trasse 7b, 10115 Berlin (DE); BERLIN, Kurt (DE/DE);
Marlenkilteweg 4, 14557 Stahnsdorf (DE).

(21) International Application Number: PCT/EP01/02945

(22) International Filing Date: 15 March 2001 (15.03.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
100 15 847.0 15 March 2000 (15.03.2000) DE
100 19 058.8 6 April 2000 (06.04.2000) DE
100 19 173.8 7 April 2000 (07.04.2000) DE
100 32 529.7 30 June 2000 (30.06.2000) DE
100 23 826.1 1 September 2000 (01.09.2000) DE(74) Agents: SCHÖNE, Stefan et al.; Boehmer & Boehmer;
Patenzollerstrasse 20-22, 80336 München (DE).(51) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, 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, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(54) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
[Continued on next page](71) Applicant (for all designated States except US): EPISCLE-
NOMICS AG (DE/DE); Kastanienallee 25, 10435 Berlin
(DE).

(54) Title: DIAGNOSIS OF DISEASES ASSOCIATED WITH THE CELL CYCLE

CG TG

CG TG



I

II

(57) Abstract: The present invention relates to the chemically modified genomic sequences of genes associated with cell cycle, to oligonucleotides and/or PNA oligomers for detecting the cytosine methylation state of genes associated with cell cycle which are directed against the sequence, as well as to a method for ascertaining genetic and/or epigenetic parameters of genes associated with cell cycle.

WO 01/068911 A2

WO 01/068911 A2 

IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, OAPI patent (BE, BL, CL, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(48) Date of publication of this corrected version:
24 October 2002

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 43/2002 of 24 October 2002, Section II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 September 2001 (20.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/068911 A3

- (51) International Patent Classification: **C12Q 1/68**
G01N 33/50, B01J 19/00, C12N 15/11, A61K 31/70
- (74) Agents: **SCHOHE, Stefan et al.**; Boehmen & Boehmer, Ferenhofstrasse 20 22, 80336 München (DE).
- (21) International Application Number: **PCT/EP01/02945**
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GR, GU, 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.
- (22) International Filing Date: **15 March 2001 (15.03.2001)**
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European 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).
- (25) Filing Language: **English**
- (26) Publication Language: **English**
- (30) Priority Data:
100 13 847.0 15 March 2000 (15.03.2000) DE
100 19 058.8 6 April 2000 (06.04.2000) DE
100 19 173.8 7 April 2000 (07.04.2000) DE
100 37 579.7 30 June 2000 (30.06.2000) DE
100 15 826.1 1 September 2000 (01.09.2000) DE
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): **EPIGE-
NOMICS AG** (DE/DE); Kastanienallee 24, 10435 Berlin
(DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **OLEK, Alexan-
der** (DE/DE); Schöckerstrasse 13/2, 10115 Berlin (DE);
PIEPENBROCK, Christian (DE/DE); Schwarzkopfs-
strasse 7b, 10115 Berlin (DE); **BERLIN, Kurt** (DE/DE);
Mörkenfelderweg 4, 11553 Stahnsdorf (DE).
- Published:
*with international search report
with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau*
- (98) Date of publication of the international search report:
28 November 2002
- (15) Information about Correction:
[Continued on next page]

(54) Title: **DIAGNOSIS OF DISEASES ASSOCIATED WITH THE CELL CYCLE**

CG TG

CG TG



I

II

(57) Abstract: The present invention relates to the chemically modified genomic sequences of genes associated with cell cycle, to oligonucleotides and/or PNA oligomers for detecting the cytosine methylation state of genes associated with cell cycle which are directed against the sequence, as well as to a method for ascertaining genetic and/or epigenetic parameters of genes associated with cell cycle.

WO 01/068911 A3

WO 01/068911 A3



Previous Corrections:
see PCT Gazette No. 43/2002 of 24 October 2002, Section II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/02945
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 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBL, EMBASE		
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] Acc.no. M35295, 27 April 1993 (1993-04-27) XP002183332	1
Y	abstract -& KRUH G D ET AL: "THE COMPLETE CODING SEQUENCE OF ARG DEFINES THE ABELSON SUBFAMILY OF CYTOPLASMIC TYROSINE KINASES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 87, no. 15, 1990, pages 5802-5806, XP002183813 the whole document ---	3-32
X	WD 92 02557 A (US GOVERNMENT) 20 February 1992 (1992-02-20)	1
Y	page 16, line 4 - line 16; figure 5 --- -/-	3-32
☒ Further documents are filed 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 rebut the publication date of another claim 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 indicate 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 November 2001		Date of making of the international search report 15.02.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2 NL - 2000-WV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 051 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bradbrook, D

Form PCT/IS/210 (second sheet) (July 1982)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internet Application No. PCT/EP 01/02945
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
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 ---	3-32
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 24 -page 33, line 31 page 92, line 22 -page 103, line 18 ---	3-32
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 ---	11-27
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 cited in the application page 2258, column 2, paragraph 2 -page 2261, column 2, paragraph 1 ---	16-29,32
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 page 9821, column 1, paragraph 1 -page 9822, column 2, paragraph 1; table 1 ---	3-32
Y	GONZALGO ET AL: "LOW FREQUENCY OF p16/CDKN2A METHYLATION IN SPORADIC MELANOMA: COMPARATIVE APPROACHES FOR METHYLATION ANALYSIS OF PRIMARY TUMORS" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 57, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 5336-5347, XP002119871 ISSN: 0008-5472 abstract -----	3-32

Form PCT/ISA210 (continuation of sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/EP 01/02945
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.: 30, 31 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/219	
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: see additional sheet	
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, 3-32 (in part)	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/EP 01/02945

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1,3-32 (in part)

International Application No. PCT/EP 01/02945

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim 30 encompasses a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
Although claim 31 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 30,31

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy (claim 31)

Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method practised on the human or animal body (claim 30)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

 International Application No.
PCT/EP 01/02945

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9202557	A	20-02-1992	US 5693778 A 02-12-1997
			AU 8516991 A 02-03-1992
			WO 9202557 A1 20-02-1992
WO 9928498	A	10-06-1999	DE 19754482 A1 01-07-1999
			AU 2408599 A 16-06-1999
			CN 1283235 T 07-02-2001
			WO 9928498 A2 10-06-1999
			EP 1034309 A2 13-09-2000
			HU 6109424 A2 28-06-2001
			JP 2001525181 T 11-12-2001
			PL 341681 A1 23-04-2001
			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 6155501 A 05-12-2000
			US 6045996 A 04-04-2000
			US 6309823 B1 30-10-2001
			US 5861242 A 19-01-1999
			US 5637832 A 17-11-1998

Form PCT/ISAO/10 (patent family annex) (July 1992)

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 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	F

- (31)優先権主張番号 100 32 529.7
 (32)優先日 平成12年6月30日(2000.6.30)
 (33)優先権主張国 ドイツ(DE)
 (31)優先権主張番号 100 43 826.1
 (32)優先日 平成12年9月1日(2000.9.1)
 (33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(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,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,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

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02
 2G054 AA06 CE02 EA03 GA04
 4B024 AA12 AA14 CA04 CA09 HA14 HA19
 4B063 QA19 QQ43 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34

专利名称(译)	诊断与细胞周期有关的疾病		
公开(公告)号	JP2004507213A	公开(公告)日	2004-03-11
申请号	JP2001567390	申请日	2001-03-15
[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	オレックスアレグザンダー ピーペンブロッククリスチャン ベリンクルト		
发明人	オレックス アレグザンダー ピーペンブロック クリスチャン ベリン クルト		
IPC分类号	G01N27/62 A61K31/7088 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/82 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58 G01N37/00		
CPC分类号	C07K14/82 C07K14/4703 C12Q1/6886 C12Q2600/154		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N27/62.V G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G054/AA06 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 4B024/AA12 4B024/AA14 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA14 4B024/HA19 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34		
代理人(译)	庄司隆		
优先权	10013847 2000-03-15 DE 10019058 2000-04-06 DE 10019173 2000-04-07 DE 10032529 2000-06-30 DE 10043826 2000-09-01 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了细胞周期相关基因的化学修饰的基因组序列以及用于检测针对该序列的细胞周期相关基因的胞嘧啶甲基化状态的寡核苷酸和/或PNA-低聚物。 , 一种用于识别与细胞周期相关的基因的遗传和/或表观遗传参数的方法。 本发明已经发现细胞周期相关基因的遗传和表观遗传学参数, 特别是它们的胞嘧啶甲基化模式, 特别适用于细胞周期相关疾病的诊断和/或治疗。 是基于。 [选型图]图1

