

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506850

(P2005-506850A)

(43) 公表日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	Z N A A 4 B O 2 4
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	M 4 B O 6 3
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2003-540386 (P2003-540386)	(71) 出願人	500247105 エビゲノミクス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成14年10月25日 (2002.10.25)		ドイツ国、10178 ベルリン、クライ ネ プレジデンテンシュトラッセ 1
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月26日 (2004.4.26)	(74) 代理人	100093735 弁理士 荒井 鐘司
(86) 国際出願番号	PCT/DE2002/004054	(74) 代理人	100105429 弁理士 河野 尚孝
(87) 国際公開番号	W02003/038121	(74) 代理人	100108143 弁理士 嶋崎 英一郎
(87) 国際公開日	平成15年5月8日 (2003.5.8)	(72) 発明者	ベルリン、クルト ドイツ国、14532 スターンスドルフ 、マリーンケーフェルヴェーク 4
(31) 優先権主張番号	101 54 317.4		
(32) 優先日	平成13年10月26日 (2001.10.26)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固定化DNA試料におけるシトシンメチル化の検出方法

## (57) 【要約】

下記の各処置を実施することからなる、ゲノムDNA試料中のシトシンメチル化標本の解析方法及び上記方法を、患者または各個人にとって、好ましくない症状の診断及び/または予診のために使用すること及び上記方法を使用して診断及び/または予診を行う際、使用することができるキット。

ゲノムDNA試料を、細胞または他のこれに付随する物質から分離し、本質的、非可逆的に表面に結合させ、表面に結合したDNAが、シトシンはDNA二重鎖における塩基対挙動が異なる塩基に変化し、一方、5-メチルシトシンは変化しないままでいるように、好ましくは、重亜硫酸塩（ジ亜硫酸塩、亜硫酸水素塩）で処理し、使用された処理剤を水洗で除去し、固定化されたDNAの選択された断片をポリメラーゼ反応で増幅し、増幅産物の配列を調査する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記の各処置を実施することを特徴とするゲノム DNA 試料中のシトシンメチル化標本の解析方法。

- a) ゲノム DNA 試料が、細胞または他のこれに付随する物質から分離され、本質的、非可逆的に表面に結合させられる。
- b) 表面に結合した DNA が、シトシンは DNA 二重鎖における塩基対挙動が異なる塩基に変化し、一方、5-メチルシトシンは変化しないままでいるように、好ましくは、重亜硫酸塩（ジ亜硫酸塩、亜硫酸水素塩）で処理される。
- c) 処置 b) で使用された処理剤が水洗で除去される。
- d) 固定化された DNA の選択された断片がポリメラーゼ反応で増幅される。
- e) 増幅産物の配列が調査される。

10

## 【請求項 2】

下記の追加の処置を実施することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

- f) 処理剤及びポリメラーゼ反応産物が、洗浄処置で除去される。
- g) 処置 d) のそれとは異なる、更に選択された、固定化 DNA の断片がポリメラーゼ反応で増幅される。
- h) 増幅産物がそれらの配列に関して調査される。

## 【請求項 3】

処置 g) による増幅毎に、前出の増幅のうちの一つの断片とは異なる断片が増幅され、処置 f) ~ g) が数回、繰り返し実施されることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 4】

DNA の結合が表面で共有結合であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

DNA が固定化処置で直接分離されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

DNA の分離が血液全体または血清から行われることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

30

## 【請求項 7】

DNA の分離が溶解組織から行われることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

溶解がプロテナーゼ K により行われることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

固定化が、96 または 384 の容器を有するマイクロ滴定プレートで行われ、該容器中で異なる DNA 試料を固定化することを特徴とする請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

固定化が、PCR 反応容器で行われ、該容器中で異なる DNA 試料を固定化することを特徴とする請求項 1 ~ 9 の何れか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 11】

DNA の固定化が、金属酸化物、好ましくは、酸化アルミニウムに行われることを特徴とする請求項 1 ~ 10 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

固定化が疎水性物質で行われ、選択された緩衝条件のもとでのみ、結合が本質的に非可逆であることを特徴とする請求項 1 ~ 10 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

増幅処置が幾つかのプライマー対を用いて、多段 PCR として行われることを特徴とする請求項 1 ~ 12 の何れか 1 項に記載の方法。

50

## 【請求項 14】

固定化 DNA 試料の増幅産物の全てまたは大部分がプールされ、共同で更に解析されることを特徴とする請求項 1 ~ 13 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 15】

この更なる解析においては、オリゴヌクレオチドアレーまたは PNA (ペプチド核酸) - アレーのハイブリッド化を行うことを特徴とする請求項 13 または 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

増幅期間中の解析がリアルタイムの PCR 法で行われることを特徴とする請求項 1 ~ 14 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 17】

増幅後の解析が同じ反応容器で、溶解曲線によって行われることを特徴とする請求項 1 ~ 14 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 18】

解析がオリゴヌクレオチドの対立遺伝子特異性ハイブリッド化によるか、または、増幅産物中の調査されるべき位置の PNA s (ペプチド核酸) によって行われることを特徴とする請求項 1 ~ 14 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 19】

解析がオリゴヌクレオチドプライマーのハイブリッド化及びそれに続くプライマー伸長反応または配列化反応によって行われることを特徴とする請求項 1 ~ 14 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 20】

患者及びまたは各個人に発生する好ましくない症状の診断及びまたは予診のための請求項 1 ~ 19 の何れか 1 項に記載の方法の使用であって、この際、好ましくない症状は下記のカテゴリーの少なくとも一つに属する。

薬の副作用；癌；CNS 機能欠損、障害または疾病；攻撃的徴候または異常行動；脳障害による臨床的、心理的及び社会的帰結；精神異常及び人格異常；痴呆及び/または関連した症候群；心臓血管系疾患、その機能欠損及び傷害；胃腸の領域の機能欠損、傷害または疾病；呼吸器系の機能欠損、傷害または疾病；障害、炎症、感染、免疫性及び/または回復期；発育期の偏向的な機能欠損、傷害または疾病；皮膚、筋肉、結合組織、または骨の機能欠損、傷害または疾病；内分泌系及び代謝系の機能欠損、傷害または疾病；頭痛または性的機能欠損。

## 【請求項 21】

細胞タイプまたは組織の区分または細胞分類の調査のための請求項 1 ~ 20 の何れか 1 項に記載の方法の使用。

## 【請求項 22】

請求項 1 の b 記載の DNA 処理用薬剤の一種、増幅産物の製造用の少なくとも二つのプライマーオリゴヌクレオチド、DNA 試料の固定化用固相、並びに、選択的に、溶剤及び請求項 1 ~ 18 の何れか 1 項に記載の一つのアッセイを実施するための手引書、からなるキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は固定化 DNA 試料におけるシトシンメチル化の検出方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年の分子生物学における手法の開発による研究的観察は遺伝子自体、この遺伝子の RNA の解読、そこから発生する蛋白などについてである。個々の開発過程で、どの遺伝子が評価されるか、そして、いかにして、特定の細胞及び組織における特定の遺伝子の活動及び阻害が制御されるか、は遺伝子またはゲノムのメチル化の程度及び性格と関連づけることができる。個々の遺伝子またはゲノムが変化したメチル化サンプルにおいて、病気の状

10

20

30

40

50

態が表現される。

【0003】

5 - メチルシトシンは最も頻繁にでる、真核細胞のDNAにおける共有結合で修飾された塩基である。これは例えば、遺伝子刷り込み時の転写規制及び腫瘍遺伝子において、一定の役割を演じる。遺伝子情報の構成部分としての5 - メチルシトシンの同定は、それ故に、非常に興味ある問題である。5 - メチルシトシンの位置は、5 - メチルシトシンがシトシンと同様な塩基対挙動を示すので、配列化によっては同定することができない。PCR増幅では5 - メチルシトシンが有する後成的情報は完全に失われている。

【0004】

比較的新しく、最も頻繁に使用されるDNAの5 - メチルシトシンの調査方法は、シトシンと重亜硫酸塩との特殊な反応に基づく。シトシンは後続するアルカリ加水分解により、ウラシルに変化し、これはその塩基対挙動がチミジンに対応する。それに対して、5 - メチルシトシンは、この条件下では変化しない。このようにして、元のDNAが変化し、元来、シトシンのハイブリッド化挙動によっては、シトシンと区別できなかった5 - メチルシトシンは、今や、“通常”の分子生物学的技法によって、唯一、残存するシトシンとして、例えば、増幅及びハイブリッド化または配列化によって、検出され得るようになった。これら全ての技法は、現在、完全に利用し尽くされている塩基対に基づく。従来の技術は、感度に関して、調査されるDNAをアガロースマトリックスに封入し、それによって、DNAの拡散及び再結合（重亜硫酸塩は単鎖DNAとのみ反応する）が阻害され、全ての沈殿及び精製工程が迅速な透析によって、取って代られるものである（Olek A, Oswald J, Walter J. 変化し、改善された重亜硫酸塩ベースのシトシンメチル化分析。Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15; 24 (24): 5064~6）。これらの方法によって、個々の細胞を調べることができ、この方法の潜在的効果が具体的に説明される。勿論、これまでに、単に、個々の領域で、約3,000塩基対長までが調べられたに過ぎず、数千に及ぶ細胞のメチル化解析の調査は可能ではない。またこれらの方法では、僅かな量の試料からの小さな断片から、信頼性のある解析は不可能である。これらの方法では拡散防止の措置にも拘らず、マトリックスから、これら試料が逸失する。

【0005】

5 - メチルシトシンを検出する既知の可能性についての概観は、以下の概観の刊行物から知ることができる。即ち、Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res .1998 May 15; 26 (10): 2255~64。

【0006】

重亜硫酸塩を使用した技法は、これまで僅かな例外[z. B. 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]を除き、研究の中で使用されていたに過ぎない。しかしながら、常に、既知の遺伝子の、短い、特殊な断片が、重亜硫酸塩処理の後、増幅され、完全に配列化されるか[Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint, Nat Genet. 1997 Nov; 17 (3): 275~6]または、個々のシトシン位置が、プライマー伸長反応[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-Patent 9500669]によって、または、一つの酵素断片[Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res. 1997 Jun. 15; 25 (12): 2532~4]によって検出される。さらに、ハイブリッド化による検出も記載されている(Olek et al., WO 99 28498)。

【0007】

尿素はゲノムDNAの5 - メチルシトシンの配列化前の重亜硫酸塩の処理の効率を高める[Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. 尿素はゲノムDNAの5' - メチルシトシ

ンの配列前の重亜硫酸塩の処理の効率を高める。Nucleic Acids Res. 1998 Nov 1; 26 (21): 5009~10 ]。

【0008】

その他の、個々の遺伝子のメチル化検出のために重亜硫酸塩技法を使用することについて、記載されている刊行物は以下のものである。

Grigg G、Clark S. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. Bioassays . 1994 Jun. ; 16 (6): 431~6、431; Zeschnigk M、Schmitz B、Dittrich B、Buiting K、Horsthemke B、Doerfler W、Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndorome 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 in 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 95/45560。

10

【0009】

更に公知の方法は、所謂、メチル化感受性PCRである[Herman JG、Graff JR、Myohanen S、Nelkin BD、Baylin SB (1996)、Methylation-specific PCR: CpG島のメチル化状態の新規なPCRアッセイ。Proc Natl Acad Sci USA. Sep 3; 93 (18): 9821~6]。この方法には、当該位置がメチル化されていないDNAの重亜硫酸塩処理により発生する、配列のみをハイブリッド化するか、または、当該位置がメチル化されていないDNAの重亜硫酸塩処理により発生する、核酸にのみ結合する、逆プライマーであるかの、何れかのプライマーが使用される。これらのプライマーで、その検知が、再び、プライマーが結合する試料中のメチル化または非メチル化位置を提示する、増幅産物が生産される。

20

【0010】

より新しい方法は、メチル-ライト(Methyl-Light)として知られている、タクマン(Taqman)PCRによるシトシンメチル化の検出である(WO 00/70090)。この方法により、個々のまたは少数の位置のメチル化状態を、直接PCRの過程で検出することが可能であるから、続いて生産物の分析をする必要がない。

30

【0011】

オリゴマーアレーの製造における従来技術の概観は1999年1月のネイチャージェネティックスの特別版に記載がある(Nature Genetics特別版、21巻1999年1月)。そこで引用されている文献及び、米国特許第5994065号には、非特異的背景信号での、オリゴヌクレオチドのような目的分子のための固体担体の製造方法が記載されている。

【0012】

固定化DNAアレーの調査には、多重蛍光マーカータグを帯びたゾンデが使用されている。特に、その都度、ゾンデの5'-OHにCy3及びCy5色素を一回帯びさせた蛍光マーカータグが好適である。ハイブリッド化ゾンデの蛍光の検出は、例えば、コンフォカール顕微鏡を使用して行なわれる。Cy3及びCy5色素は他の類似物と共に市販されている。

40

【0013】

マトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI-TOF)は分子生物学の解析において非常に有力な発展をもたらした[Karas M、Hillenkamp F. 1988 Oct. 15; 60 (20): 2299~301]。ある被分析物は光吸収性マトリックス中に埋め込まれる。短時間のレーザー照射によって、マトリックスが蒸発し、被分析分子は断片化せずに、ガス相に移行する。マトリックス分子の衝撃により、被分析物のイオン化が達成される。電圧をかけられてイオンが飛行管中へ加速される。分子量の差により、イオンは異なる強さで加速される。小さいイオンは大きいイオンよりも早い時期に検出器に達する。

50

## 【0014】

MALDI-TOF質量分析は蛋白質及びペプチドの解析(分析)にとりわけ優れている。核酸の分析用としてはやや難点がある[Gut, I. G. und Beck S. (1995)、DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147~157]。核酸については、検出感度がペプチドの場合の100倍も悪く、断片のサイズが増えるに従って、超比例的に減少する。骨格に多くの負電荷を有している核酸は、マトリックスによるイオン化が本質的に非効率的である。MALDI-TOF質量分析ではマトリックスの選択が、非常に重要な役割を演じる。

ペプチドの脱離には、非常に細かい結晶の、有用なマトリックスを使用することが発見された。DNAのためには、幾つかの効果的なマトリックスがあり、その使用によって、感度の差異は減少しなかった。感度の差異は、DNAをペプチドに類似するように化学変化させることにより、減少させることができる。通常骨格の燐酸塩が、チオ燐酸塩によって、置換されるところの、核酸リンチオエートは、簡単なアルキル化反応によって、電荷的に中性なDNAに変換される[Gut I. G. und Beck S. (1995)、DNAの選択的アルキル化及び質量分析による検出法. Nucleic Acids Res. 23: 1367~1373]。チャージタッグのこの変化したDNAへの結合は、ペプチドに見られるのと同じ程度の感度上昇をもたらす。更なるチャージタギングの利点は、変化しない基質の検出を著しく困難にする不純物の分析安定性を高めることである。

10

## 【0015】

ゲノムDNAは標準的方法によって、細胞、組織または他の試料から得られる。この標準的方法はフリッチェ(Fritsch)及びマニアティス(Maniatis)による、分子クローン: 研究手引1989年のような参考文献に載っている。

20

## 【0016】

PCRの発明後、後続の数年の間に、この技術をDNAの増幅のために使用できるように改善された、多数の変形が公知となっている。特に、ここでは、PCRの多段化(多段PCR)について述べる。このとき、2以上の特殊なプライマーが使用され、それにより、一つの反応容器で多数の、異なる、特殊な、増幅が為され得る。特に、とりわけ微量のDNAの検出に使用される、所謂、巢作り(Nested)PCRに興味がある。この種のPCRは二つの交互に起こる増幅から成り、二つの増幅のプライマーは最初の増幅産物の内部に存在し、最初の増幅のプライマーとは同一ではない。最初の増幅で、意図した断片が生産されたときのみ、第二の増幅のプライマーが作用するので、それによって特別な特異性が達成される。それに反して、最初の何らかの副生物の増加は、第二の増幅で同様に見られない。

30

## 【0017】

従来のメチル化解析の方法は、重亜硫酸塩反応を含み、重亜硫酸塩反応の塩の高含量が阻害的に働くので、反応溶液を直接、次のポリメラーゼ連鎖反応に投入できないという不利な点を例外なく有する。そのため、実施において、多くの精製及び/または洗浄処置が行われねばならず、そのことは、特に、DNAの試料量が少ないとき、プロトコルの再現性の低さ、煩雑な処理及び方法の感度の低さの原因となる。また、他の分子生物学のアッセーのように、DNAは重亜硫酸塩反応で使用される前に、先ず分離されねばならない。

40

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0018】

故に、本発明の課題は従来技術の問題点を解決することである。

## 【0019】

上記課題は、下記の各処置を実施するゲノムDNA試料中のシトシンメチル化標本の解析方法により解決される。

a) ゲノムDNA試料を、細胞または他のこれに付随する物質から分離し、本質的、非可逆的に表面に結合させる。

b) 表面に結合したDNAが、シトシンはDNA二重鎖における塩基対挙動が異なる塩基

50

に変化し、一方、5-メチルシトシンは変化しないままに、好ましくは、重亜硫酸塩（ジ亜硫酸塩、亜硫酸水素塩）で処理される。

c) 処置b)で使用された処理剤が水洗で除去される。

d) 固定化されたDNAの選択された断片がポリメラーゼ反応で増幅される。

e) 増幅産物の配列が調査される。

【0020】

次の付加的処置を実施するのが有効である。

f) 処理剤及びポリメラーゼ反応産物が、洗浄処置で除去される。

g) 処置d)のそれとは異なる、更に選択された、固定化DNAの断片がポリメラーゼ反応で増幅される。

10

h) 増幅産物の配列が調査される。

【0021】

本発明においては、更に、処置g)による増幅毎に、前出の増幅のうちの一つの断片とは異なる断片が、増幅され、処置f)~g)が数回、繰り返し実施されることが特に好ましい。

【0022】

本発明においては、DNAへの表面の結合が共有結合であることが好ましい。

【0023】

本発明においては、DNAが固定化処置で直接分離されることが好ましい。

【0024】

本発明においては、DNAの分離が血液全体または血清から行われることが好ましい。また、本発明においては、DNAの分離が溶解組織から行われることが好ましい。

20

【0025】

溶解がプロテナーゼKにより行われることが好ましい。

【0026】

本発明においては、固定化が、96または384の容器を有するマイクロ滴定プレートで行われ、該容器中で異なるDNA試料を固定化することが特に好ましい。

【0027】

本発明においては、固定化が、PCR反応容器で行われ、該容器中で異なるDNA試料を固定化することが特に好ましい。本発明においては、DNAの固定化が、金属酸化物、好ましくは、酸化アルミニウムに行われることが好ましい。

30

【0028】

本発明においては、固定化が疎水性物質で行われ、選択された緩衝条件のもとでのみ、結合が本質的に非可逆であることが好ましい。

【0029】

本発明においては、増幅処置が幾つかのプライマー対を用いて、多段PCRとして行われることが好ましい。

【0030】

本発明においては、固定化DNA試料の増幅産物の全てまたは大部分がプールされ、共同で更に解析されることが好ましい。大部分とは、増幅産物の約50%以上から75%以上であり得る。

40

【0031】

本発明においては、この更なる解析において、オリゴヌクレオチドアレーまたはPNA（ペプチド核酸）-アレーのハイブリッド化が重要であることが好ましい。

【0032】

本発明においては、増幅期間中の解析がリアルタイムのPCR法で行われることが好ましい。

【0033】

本発明においては、増幅後の解析が同じ反応容器で、溶解曲線によって行われることが好ましい。

【0034】

50

本発明においては、解析がオリゴヌクレオチドの対立遺伝子特異性ハイブリッド化によるか、または、増幅産物中の調査されるべき位置の P N A s (ペプチド核酸) によって行われることが特に好ましい。

【0035】

本発明においては、更に、解析がオリゴヌクレオチドプライマーのハイブリッド化及びそれに続くプライマー伸長反応または配列化反応のによって行われることが好ましい。

【0036】

また、患者及び/または各個人に発生する好ましくない症状の診断及び/または予診のために本発明の方法の使用することも、本発明の対象になる。この際、好ましくない症状は下記のカテゴリの少なくとも一つに属する。

薬の副作用；癌；C N S機能欠損、障害または疾病；攻撃的徴候または異常行動；脳障害による臨床的、心理的及び社会的帰結；精神異常及び人格異常；痴呆及び/または関連した症候群；心臓血管系疾患、その機能欠損及び傷害；胃腸の領域の機能欠損、傷害または疾病；呼吸器系の機能欠損、傷害または疾病；障害、炎症、感染、免疫性及び/または回復期；発育期の偏向的な機能欠損、傷害または疾病；皮膚、筋肉、結合組織、または骨の機能欠損、傷害または疾病；内分泌系及び代謝系の機能欠損、傷害または疾病；頭痛または性的機能欠損。

【0037】

細胞タイプまたは組織の区分または細胞分類の調査のために、本発明の方法を使用することが好ましい。

【0038】

更に、処置b記載の D N A 処理用薬剤の一種、増幅産物の製造用の少なくとも二つのプライマーオリゴヌクレオチド D N A 試料の固定化用固相、並びに、選択的に、溶剤及び本発明の方法の一つによるアッセイを実施するための手引書、からなるキットが本発明の対象になる。

【0039】

本発明に基づく課題解決の本質は、D N A が、とにかく、例えば、血液全体、血清または組織から分離された範囲内で、固相に結合させられ、続いて、固相上で、直接重亜硫酸塩反応に供されることにある。このケースで非常に簡単な、水または好適な緩衝液で達成される重亜硫酸塩反応混合物分離の後、固定化 D N A が直接増幅に使用され得る。その代わりに、この固定化の形態で蓄積され、必要時に増幅に使用される。固定化 D N A は増幅によって、本質的に変化しないので、既に行われた増幅反応の成分が洗浄処置で除去された後に、固定化 D N A を鋳型として、多くの後続する増幅を実行することが可能になる。

【0040】

総体的に、本発明は、重亜硫酸塩処理によるメチル化アッセイを著しく簡素化して、本発明の方法を任意に、自由に使用できるようにしている。試料 D N A は固相に直接結合させられ、重亜硫酸塩処理が固相上で行われ、次いで、全く同じ固相上で、ポリメラーゼ反応が行われる。血清から採取した微量の D N A の安定したアッセイが実行され得る。

【0041】

固相が、その中で P C R 反応が行われ反応器の変化した表面であるのも好適であり、また、8条の溝のあるもの、または、微量滴定板の部分としての市販の反応容器も好適である。本発明の本質的な課題は、一方では、D N A をできるだけ非可逆的に結合させることができ、他方では、重亜硫酸塩処理における条件下、十分に安定性が継続し、D N A を結合したままで保持することのできる表面を提供することにある。

【0042】

この目的を満足する二つの表面が同じであることが証明される。一方は酸化アルミニウムであり、他方は、化合物中でトリエチルアンモニウムイオンのような好適な陽イオンと D N A との結合を可能にするような、C 1 8 - アルキル鎖である。C 1 8 - アルキル鎖は専門家に知られているシラン化法によりオクタデシルトリアルコキシシランを使用して調製できる。表面の酸化アルミニウムによる変性法は U S 6 , 2 9 1 , 1 6 6 に記載されてい

10

20

30

40

50

る。

【0043】

本発明のシトシンメチル化標本の解析方法は以下の各処置からなる。

1. ゲノムDNA試料を、細胞または他のこれに付随する物質から分離し、本質的、非可逆的に表面に結合させる。

2. 表面に結合したDNAが、シトシンはDNA二重鎖における塩基対挙動が異なる塩基に変化し、一方、5-メチルシトシンは変化しないままでいるように、好ましくは、重亜硫酸塩（ジ亜硫酸塩、亜硫酸水素塩）で処理される。

3. 第二処置で使用された処理剤が水洗で除去される。

4. 固定化されたDNAの選択された断片がポリメラーゼ反応で増幅される。

10

5. 増幅産物の配列が調査される。

本発明の特に好ましい変形は次の付加的処置で実施される。

6. 処理剤及びポリメラーゼ反応産物が、洗浄処置で除去される。

7. 処置d)のそれとは異なる、更に選択された、固定化DNAの断片がポリメラーゼ反応で増幅される。

8. 増幅産物がそれらの配列に関して調査される。

【0044】

更に、特に、好ましい本発明の変形は、処置6～8が数回、繰り返し実施される。

【0045】

本発明の方法の最初の処置で、好ましいゲノムDNAは、細胞または他のこれに付随する物質から分離し、本質的、非可逆的に表面に結合させられる。

20

【0046】

本発明における非可逆的結合とは、反応条件下で通常、使用される手段では、再び完全に、解離されない結合を云う。この結合は好ましくは共有結合、イオン対結合または静電氣的または疎水的効果に基づく結合である。

【0047】

DNAの分離は、好ましくは、体液または組織溶解物が、好ましくはDNAと非可逆的に結合する表面と接触するようにして為される。そのためには、C18物質の場合、特殊なバッファーが必要である（例えば、トリエチルアンモニウムアセテート）。残余は除去され、後続の重亜硫酸塩反応が、できる限り清浄な出発物質で行われるように、バッファーまたは水で（または両者で）後洗浄される。

30

【0048】

本発明の特に好ましい変形において、DNAの表面への結合は共有結合である。更に、特に、好ましい本発明の変形において、DNAは直接固定化処置で分離される。DNAの分離は好ましくは血液全体または血清から為される。

【0049】

更に、特に、好ましい本発明の変形において、DNAの分離は組織溶解物から為される。溶解は特に好ましくはプロテナーゼKにより行われる。

【0050】

更に、特に、好ましい本発明の変形において、固定化は、96または384の容器を有するマイクロ滴定プレートで行われ、該容器中で異なるDNA試料を固定化する。

40

【0051】

更に、特に、好ましい本発明の変形において、固定化は、PCR反応容器で行われ、該容器中で異なるDNA試料を固定化する。

【0052】

特に好ましくは、DNAの固定化は、金属酸化物、好ましくは、酸化アルミニウムに行われる。更に、特に、好ましい本発明の変形において、固定化が疎水性物質で行われ、結合が選択された緩衝条件のもとでのみ、本質的に非可逆に行われる。

【0053】

解析されるDNAは好ましくは通常のDNA供給源から得られる。これらの供給源は例え

50

ば、細胞系、血液、痰、便、尿、脳脊髄液；例えば、眼球、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房または肝臓等の各組織のパラフィン埋蔵標本；組織の顕微鏡標本及びこれらの可能な組合わせである。

【0054】

本発明の方法の第二処置では表面に結合したDNAが、全ての、塩基の5位置ではない、メチル化シトシンが変化し、塩基対挙動が異なる塩基が生成し、一方5位置のメチル化シトシンは変化しないままであるように、好ましくは、重亜硫酸塩（=ジ亜硫酸塩、亜硫酸水素塩）で処理される。

【0055】

重亜硫酸塩を使用するときは、DNAと表面との強固な結合を保証するために、C18表面の場合はトリアルキルアンモニウム重亜硫酸塩の使用が特に好ましい。酸化アルミニウム表面の場合、重亜硫酸ナトリウムの使用が好ましい。

【0056】

DNA試料は、特に好ましくは、処理前に、加熱または、例えば、希釈苛性ソーダ（好ましくは、0.1～0.3モル）のような、アルカリ性薬剤を使用して変性される。

【0057】

反応に重亜硫酸塩が使用されたとき、非メチル化シトシン塩基に付加が起こる。本発明の方法においては、変性剤または溶剤及びラジカル捕捉剤の存在が好ましい。

【0058】

このとき、変性剤または溶剤としては下記の化合物または化合物集団の使用が好ましい。即ち、ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキサン及びその置換誘導体、尿素及びその誘導体、アセトニトリル、一級アルコール、二級アルコール、三級アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコールジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、DMSOまたはTHF。とにかく、DNAのアガロースへの埋め込みは、変性の後に、溶解させた変性剤を添加することによって可能になり、次いで、オレック（Olek）らによって公開された方法に類似した方法で冷却する。アガロースは重亜硫酸塩処理後に、加熱バッファーまたは熱水で除去される。

【0059】

これに続くアルカリ加水分解（好ましくはトリスバッファーpH10またはアンモニア）は非メチル化シトシン核酸塩基をウラシルに変換させる。続いて、好ましくは、DNAの脱硫（10～30分、90～100）がアルカリ性pH値で行われる。

【0060】

本発明の第三処置では、それ以前に使用された処理剤が水洗処置で除去される。このとき、固定化され、今や化学処理されたDNAが表面に結合したままであることが重要である。これは、例えば、表面への共有結合の場合が簡明である。それに対して、例えば、C18相への結合がトリエチルアンモニウム陽イオンを用いてなされた場合は、対応するバッファーが必要である。このとき、洗浄処置で、例えば、トリエチルアンモニウムアセテート-バッファーのような、DNAが疎水相に結合するときに必要なバッファーが要求される。

【0061】

好ましくは多くの洗浄処置が実施され、該処置は水またはバッファーが添加され、それに続く、その都度、バッファーまたは水が除去されるような、滴定処置からなる、自動滴定処置からなるものが特に好ましい。これは、例えば、微量滴定プレートにおけるDNAの固定化及び市販の滴定ロボット（例えば、Tecan社またはQiagen社製）の使用の際重要である。

【0062】

第四処置では、固定化され、処理されたDNAの選択された断片が増幅される。

【0063】

10

20

30

40

50

DNA 試料は、好ましくは耐熱性 DNA ポリメラーゼを使用する、ポリメラーゼ連鎖反応で増幅される。多くの DNA 断片の増幅は好ましくは反応容器中で行われる。

【0064】

第四処置は、二つの処置で実施するのが好ましい。一つの処置は、異なる配列をもつ少なくとも一対のプライマーを用いた PCR プレ増幅で開始する。そのプライマーは、非特異的に前処理した DNA にハイブリダイズし、それにより、1 以上の増幅産物が PCR 処理されることになる。その後、プレ増幅で形成された産物の PCR 増幅が異なる配列をもつプライマーを用いて行われる。該プライマーは、それぞれ同一又は前処理 DNA 試料〔(+) - 鎖または (-) - 鎖〕の断片に対して、逆相補的であり、増幅すべき DNA に特異的にハイブリダイズする。

10

【0065】

本発明の特に好ましい変形された方法は、一つの増幅処置が、多くのプライマー対を使用し、多段 PCR で行われる。固定化 DNA 試料の増幅産物の全て、または、大部分がプールされ、共同で更に解析されることが特に好ましい。増幅後の反応混合物が、固定化 DNA が結合している反応容器から取り出されることが特に好ましい。このようにして、固定化 DNA が、更なる増幅用鋳型として、好ましくは、これより前に使用されなかったプライマーによる増幅用鋳型として、自由に使用できる。

【0066】

本発明の特に好ましい変形された方法は、下記の付加的処置を含む、増幅が異なるプライマーで多数回繰り返される。

20

- 1) ポリメラーゼ反応に使用された薬剤及び産物は洗浄で除去される。
- 2) それ以前に、増幅されたものとは異なる、更に選択された DNA の断片が、ポリメラーゼ反応で増幅される。
- 3) 増幅産物とその配列に関して調べられる。

【0067】

本発明の特に好ましい変形された方法は、これらの処置が幾度も繰り返される。このとき、処置 2) の増幅毎に、これまで行われた増幅とは異なる他の断片が増幅される。

【0068】

最後の処置で、上述の付加的処置が実施されるとしても、増幅産物はその都度、その配列に関して調べられる。それによって、直接 DNA 試料の選択されたシトシン塩基のメチル化状態が推論される。

30

【0069】

これらの配列解析とそれに続く、メチル化状態に関する推論は、原理的に、多くの、専門家に熟知された、従来公知の方法によって為される。

【0070】

オリゴヌクレオチドアレーまたは PNA (ペプチド核酸) アレーに関する増幅産物のハイブリッド化による解析が為されることが特に好ましい。

【0071】

更に、増幅期間中の解析がリアルタイムの PCR 法で行われることが好ましい。本発明の方法の変形においては、DNA 抽出、重亜硫酸塩処理、増幅及び検知に関する処置が、リアルタイム PCR で、一つの反応容器で実施できることが特に好ましい。これに関連して、増幅後の解析が同じ反応容器で、溶解曲線によって行われ、溶解挙動から断片の塩基構成及びメチル化状態を推論する方法が特に好ましい。

40

【0072】

解析は、増幅産物の断片または増幅産物を特異的にハイブリッド化するゾンデから増幅産物の分子量を決定する、質量分析計を表面に適用することによっても、行うことができる。この情報は、もし、配列の大部分が既に知られているならば、配列の同定に利用され得る。また、溶解させた増幅産物を別々に質量分析計に導入すること、及び、専門家が熟知している方法にしたがって解析を行うことも可能である。

【0073】

50

本発明の方法において、解析が、オリゴヌクレオチドの対立遺伝子特異性ハイブリッド化によって行われるか、または、増幅産物中の調査されるべき位置のPNA s(ペプチド核酸)によって行われることが特に好ましい。

【0074】

本発明の方法の変形において、解析がオリゴヌクレオチドプライマーのハイブリッド化及びそれに続くプライマー伸長反応、または、配列化反応によって行われることが更に特に好ましい。

【0075】

患者及び/または各個人に発生する好ましくない症状の診断及びまたは予診のための前記本発明の方法の使用もまた本発明の対象となる。この際、好ましくない症状は下記のカテゴリの少なくとも一つに属する。

10

薬の副作用；癌；CNS機能欠損、障害または疾病；攻撃的徴候または異常行動；脳障害による臨床的、心理的及び社会的帰結；精神異常及び人格異常；痴呆及び/または関連した症候群；心臓血管系疾患、その機能欠損及び傷害；胃腸の領域の機能欠損、傷害または疾病；呼吸器系の機能欠損、傷害または疾病；障害、炎症、感染、免疫性及び/または回復期；発育期の偏向的な機能欠損、傷害または疾病；皮膚、筋肉、結合組織、または骨の機能欠損、傷害または疾病；内分泌系及び代謝系の機能欠損、傷害または疾病；頭痛または性的機能欠損。

【0076】

細胞タイプまたは組織の区分または細胞分類の調査のために本発明の方法を使用することもまた同様に好ましい。

20

【0077】

DNA処理用薬剤の一種、増幅産物の製造用の少なくとも二つのプライマーオリゴヌクレオチドDNA試料の固定化用固相、並びに、選択的に、更に他の溶剤及び前記本発明の変形された方法の少なくとも一つを実施するための手引書、からなるキットもまた本発明の対象になる。

【実施例】

【0078】

下記の実施例は本発明を説明するものである。派生的反応容器中でのプロメガ(Promega)及びM13-DNAの重亜硫酸塩処理

30

【0079】

DNAの結合

反応容器の表面に積層された酸化アルミニウム上へのDNAの結合のために、切り取られたEcoR1ゲノムDNA(Promega)及びM13プラスミド-DNAが使用された。160ngが対応する反応容器に滴下され、水で全容積を20マイクロリットルとした。震盪機で短時間混合し、15分間室温で培養した。次いで、溶剤を除去し、容器を50マイクロリットルの水で洗浄した。チューブ表面の結合位置の残留活性を抑えるために、牛(Bovine)-血清アルブミンの5%溶液10マイクロリットルをこれに滴下し、40マイクロリットルの水を加え、15分間室温で培養した。次いで、容器を50マイクロリットルの水で一回洗浄した。

40

【0080】

重亜硫酸塩処理

結合しているDNAは、水の添加なしで、96で20分間エッペンドルフ-マスターサイクラー(Eppendorf-Mastercycler)で変性した。容器はその後できるだけ速く取り除かれ、これによってDNAの変性はそのまま保存された。

重亜硫酸塩反応は0.75モル重亜硫酸ナトリウム溶液の10マイクロリットル、ラジカル捕捉剤(6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸, 98.6mgを1ミリリットルのジオキササンに加えたもの)2マイクロリットル及び2マイクロリットルの水が添加された。反応容器は50で、エッペンドルフ-マスターサイクラーで5時間培養された。

50

## 【 0 0 8 1 】

## 脱硫

重亜硫酸塩完了後、溶液はピペットで抜き取られ、容器は100マイクロリットルの水及び脱硫に備えて、50mMのトリス塩酸溶液の100マイクロリットルで洗浄された。脱硫は50mMのトリス塩酸溶液の50マイクロリットルで、pH9、96で20分間行われた。50マイクロリットルの水で、3回洗浄後、反応容器はPCRによる増幅に使用可能状態となった。

## 【 0 0 8 2 】

## PCR

PCRは25マイクロリットルの縮小尺度で行った。プライマーとして、プロメガ (Promega) DNAの5' - T A A G T A T G T T G A A G A A A G A T T A T T G T A G - 3' 及び5' - T A A A A A C T A T C C C A T A A T A A C T C C C A A C - 3' 並びに5' - A T T A C A A A A T C G C G C A A A - 3' 及び5' - A A G T C G G A G G T T A A A A A G G T - 3' (MWG)、M13プラスミド-DNAが使用された。両者のプライマーは濃度12.5ピコモル/マイクロリットルの溶液とし、このプライマー対の溶液の2マイクロリットルを対応するチューブに滴下した。PCRには2.5マイクロリットルのdNTP-Mix (ファーマンタス社製、濃度2.5マイクロモル/マイクロリットル)、0.3マイクロリットルのホット・スター・タク (Hot Star Taq) (Qiagen社製)、2.5マイクロリットルの10x PCRバッファー溶液 (Qiagen社製、15マイクロモルMgCl<sub>2</sub>含有バッファー) 及び17.7マイクロリットルの水 (Fluka社製) からなる原料が容器に加えられた。

## 【 0 0 8 3 】

PCRのコントロールはゲル電気泳動により行われた。そのために、1.4%アガロースゲル (Eurogentec. 社製) に、3マイクロリットルの色素が添加された5マイクロリットルの試料を加え、運用バッファーとして1xTBEが使用された。断片はエチジウムブロマイドで染色され、ゲルはUVで印刷された。

## 【 産業上の利用可能性 】

## 【 0 0 8 4 】

本発明のゲノムDNA試料中のシトシンメチル化標本の解析方法は、従来技術の問題点を解決したもので、本発明の方法を、患者または各個人にとって、好ましくない症状の診断及び/または予診のために使用することができる。

## 【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
8. Mai 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/038121 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/04054
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
25. Oktober 2002 (25.10.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
101.54.317.4 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,  
10435 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GI,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt  
[DE/DE]; Marienkaferweg 4, 14532 Stehnsdorf (DE);  
BALLHAUSE, Matthias [DE/DE]; Toblacher Strasse 42,  
13187 Berlin (DE); GÜTIG, David [DE/DE]; Kastanien-  
allee 74, 10435 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,  
10178 Berlin-Mitte (DE).
- Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF CYTOSINE METHYLATION IN IMMOBILISED DNA SAMPLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN IN IMMOBILISIERTEN DNA  
PROBEN

WO 03/038121 A2

(57) Abstract: A method for the detection of cytosine methylation in immobilised DNA samples is disclosed. In the first method step the genomic DNA is isolated from cells or other associated material and bound essentially irreversibly to a surface. The DNA bound to the surface is then preferably treated with a bisulphite such that cytosine is converted into a base different from the base pairing relationship in the DNA duplex, whilst 5-methylcytosine remains unaltered. The used reagents are then removed in a washing step. Finally, selected sections of the immobilised DNA are amplified in a polymerase reaction and the amplicate examined with regard to the sequence thereof.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben. Im ersten Verfahrensschritt wird die genomische DNA aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden. Danach wird die an die Oberfläche gebundene DNA bevorzugt mit einem Bisulfit dazwischen behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt. Anschliessend werden die verwendeten Reagenzien in einem Waschschritt entfernt. Zuletzt werden ausgewählte Abschnitte der immobilisierten DNA in einer Polymerasereaktion amplifiziert und die Amplicake werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

**Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in immobilisierten DNA Proben**

Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-

Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällung- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphate based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 1996 DEC 15;24(24):5064-6). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modi-

WO 03/038121

PCT/DE02/04054

3

fications in DNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 1998 May 15;26(10):2255-64.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zeschnick M, Lich C, Buiting K, Dörfler 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) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet.* 1997 Nov.;17(3):275-6) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (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-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun. 15;25(12):2532-4) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphate-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1998 Nov. 1;26(21):5009-10).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind:

WO 03/038121

PCT/DE02/04054

4

Grigg G, Clark S. sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioassays*. 1994 Jun.;16(6):431-6, 431;  
Zeschnick M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Dörfler 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 und WO 95/45560.

Ein weiteres bekanntes Verfahren ist die sogenannte methylierungssensitive PCR (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996), Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 3;93(18):9821-6). Für dieses Verfahren werden Primer verwendet, die entweder nur an eine Sequenz hybridisieren, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position un-methylierten DNA entsteht, oder aber umgekehrt Primer, welche nur an eine Nukleinsäure bindet, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position un-methylierten DNA entsteht. Mit diesen Primer können demnach Amplifikate erzeugt werden, deren Detektion wiederum Hinweise auf das Vorliegen einer methylierten oder un-methylierten Position in der Probe liefern, an welche die Primer binden.

WO 03/038121

PCT/DE02/04054

5

Ein neueres Verfahren ist auch der Nachweis von Cytosin-Methylierung mittels einer Taqman PCR, das als Methyl-Light bekannt geworden ist (WO 00/70090). Mit diesem Verfahren ist es möglich, den Methylierungsstatus einzelner oder weniger Positionen direkt im Verlauf der PCR nachzuweisen, so dass sich eine nachfolgende Analyse der Produkte erübrigt.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung lässt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie Oligonucleotide bei vermindertem nichtspezifischen Hintergrundsignal entnehmen.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoresziert markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (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). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation

des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozess durch die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte

WO 03/038121

PCT/DE02/04054

7

Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Nach der Erfindung der PCR sind in den folgenden Jahren zahlreiche Varianten bekannt geworden, die diese Technik zur Amplifikation der DNA verfeinern. Insbesondere ist hier die Multiplexierung der PCR (Multiplex-PCR) zu erwähnen, wobei man mehr als 2 spezifische Primer einsetzt und dabei in einem Reaktionsgefäß eine Vielzahl von verschiedenen, spezifischen Amplifikationen erzeugen kann. Besonders interessant ist auch die sogenannte Nested PCR, welche unter anderem zum Nachweis besonders geringer DNA Mengen verwendet wird. Diese Art der PCR besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationen, wobei die Primer der zweiten Amplifikation innerhalb des ersten Amplifikates liegen und nicht mit den Primern der ersten Amplifikation identisch sind. Dadurch wird eine besondere Spezifität erreicht, da die Primer der zweiten Amplifikation nur dann funktionieren, wenn in der ersten Amplifikation das beabsichtigte Fragment erzeugt wurde. Dagegen ist die Vermehrung etwaiger Nebenprodukte der ersten Amplifikation in der zweiten so gut wie ausgeschlossen.

Die vorliegenden Verfahren zur Methylierungsanalyse, welche eine Bisulfitreaktion beinhalten, haben durchweg den Nachteil, dass die Reaktionslösung nicht unmittelbar für eine nachfolgenden Polymerasekettenreaktion eingesetzt werden kann, da der hohe Salzgehalt der Bisulfitreaktion sich störend auswirkt. Es müssen also in der Praxis mehrere Aufreinigungs- und/oder Waschschrte durchgeführt

WO 03/038121

PCT/DE02/04054

8

werden, was insbesondere bei kleinen DNA-Probenmengen zu schlechter Reproduzierbarkeit der Protokolle, umständlicher Handhabung und geringer Empfindlichkeit der Methode beiträgt. Zudem muss die DNA erst, wie auch für andere molekularbiologische Assays, isoliert werden, bevor sie in der Bisulfitreaktion eingesetzt werden kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, die Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben gelöst, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt:

- a) die genomische DNA wird aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden,
- b) die an die Oberfläche gebundene DNA wird, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,
- c) die in Schritt b) verwendeten Reagenzien werden in einem Waschschrift entfernt,
- d) ausgewählte Abschnitte der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,
- e) die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

Vorteilhaft ist es, dass man folgende zusätzliche Schritte ausführt:

- f) die Reagenzien und Produkte der Polymerasereaktion werden in einem Waschschrift entfernt,
- g) weitere ausgewählte Abschnitte, welche von denen in Schritt d) verschieden sind, der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,

WO 03/038121

PCT/DE02/04054

9

h) die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

Es ist erfindungsgemäß weiterhin besonders vorteilhaft, dass man die Schritte f)-g) mehrmals wiederholt, wobei in jeder Amplifikation nach Schritt g) andere Abschnitte amplifiziert werden als in einer der vorangegangenen Amplifikationen.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Bindung der DNA an die Oberfläche kovalent ist.

Besonders vorteilhaft ist es dabei, dass man die DNA unmittelbar in dem Immobilisierungsschritt auch isoliert.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Isolierung der DNA aus Vollblut oder Serum erfolgt. Vorteilhaft ist es erfindungsgemäß auch, dass die Isolierung der DNA aus lysiertem Gewebe erfolgt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es dabei, dass man die Lysis mittels Proteinase K durchführt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es insbesondere, dass die Immobilisierung in den Gefäßen einer Mikrotiterplatte mit 96 Gefäßen oder 384 Gefäßen erfolgt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden.

Besonders vorteilhaft ist es erfindungsgemäß auch, dass die Immobilisierung in PCR-Reaktionsgefäßen erfolgt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden. Bevorzugt ist es erfindungsgemäß, dass die Immobilisierung der DNA an einem Metalloxid, bevorzugt Aluminiumoxid, erfolgt.

WO 03/038121

PCT/DE02/04054

10

Vorteilhaft ist das erfindungsgemäße Verfahren auch, wenn die Immobilisierung an einem hydrophoben Material erfolgt und die Bindung nur unter den gewählten Pufferbedingungen im wesentlichen irreversibel ist.

Es ist erfindungsgemäß auch bevorzugt, dass ein Amplifikationsschritt mit mehreren Primerpaaren als Multiplex-PCR ausgeführt wird.

Bevorzugt ist es erfindungsgemäß dabei, dass alle oder ein großer Teil der Amplifikate einer immobilisierten DNA Probe gepoolt werden und so gemeinsam einer weiteren Analyse zugeführt werden. Ein großer Teil sind etwa 50% und mehr der Amplifikate. Es können aber auch bis zu 75 % und mehr sein.

Bevorzugt ist beim erfindungsgemäßen Verfahren auch, dass es sich bei dieser weiteren Analyse um die Hybridisierung an einen Oligonukleotidarray oder PNA (Peptide Nucleic Acids)-Array handelt.

Bevorzugt ist es erfindungsgemäß auch, dass die Analyse während der Amplifikation durch eine Realtime PCR Methode erfolgt.

Erfindungsgemäß vorteilhaft ist es auch, dass die Analyse nach der Amplifikation im gleichen Reaktionsgefäß durch die Aufnahme einer Schmelzkurve erfolgt.

- 1 Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, dass die Analyse durch allelspezifische Hybridisierung von Oligonukleotiden oder PNAs (Peptide Nucleic Acids) an die zu untersuchenden Positionen in den Amplifikaten erfolgt.
- 5 Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, dass die Analyse durch Hybridisierung von Oligonukleotidprimern und einer

WO 03/038121

PCT/DE02/04054

11

nachfolgenden Primerextensionsreaktion oder einer Sequenzierreaktion erfolgt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Bevorzugt ist erfindungsgemäß dabei, die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Kit, bestehend aus einem Reagenz zur Behandlung der DNA gemäß Schritt b, mindestens zwei Primeroligonukleotiden zur Herstellung der Amplifikate, einer Festphase zur Immobilisierung der Proben-DNA, sowie optional weiteren Lösun-

gen und einer Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem erfindungsgemäßen Verfahren.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Lösung des Problems besteht darin, dass DNA, die im Rahmen ihrer ohnehin angestrebten Isolierung aus beispielsweise Vollblut, Serum oder Gewebe ohnehin an eine Festphase gebunden wird, direkt auf dieser Festphase nachfolgend auch einer Bisulfitreaktion unterworfen wird. Nach der in diesem Falle sehr einfachen, durch Nachwaschen mit Wasser oder einem geeigneten Puffer zu erzielenden Abtrennung der Bisulfit-Reaktionsmischung kann die immobilisierte DNA unmittelbar auch direkt für die Amplifikation eingesetzt werden. Alternativ kann sie in dieser immobilisierten Form gelagert werden und erst bei Bedarf für eine Amplifikation verwendet werden. Da die immobilisierte DNA bei der Amplifikation nicht wesentlich verändert wird, ist es auch möglich, mit der immobilisierten DNA als Templat mehrere nachfolgende Amplifikationen durchzuführen, nachdem die Reaktionskomponenten der jeweils vorangegangenen Amplifikation durch Waschstschritte entfernt wurden.

Insgesamt stellt die vorliegende Erfindung also ein Verfahren zur Verfügung welches hinsichtlich der Durchführung beliebiger, auf Bisulfitbehandlung zurückgreifender Methylierungsassays eine erhebliche Vereinfachung darstellt. Die Proben-DNA muss nur noch direkt an eine Festphase gebunden werden, die Bisulfitbehandlung an dieser Festphase durchgeführt und nachfolgend unter Verwendung immer noch derselben Festphase eine Polymerasereaktion durchgeführt werden. Dies erlaubt es auch, stabile Assays ausgehend von sehr geringen DNA Mengen, etwa aus Serum, durchzuführen.

Sinnvollerweise ist die Festphase eine modifizierte Oberfläche eines Gefäßes, in welchem dann auch die PCR-Reaktion durchgeführt wird und vorteilhafterweise ein handelsübliches PCR Gefäß, welches auch als 96er Streifen oder als Teil einer Mikrotiterplatte vorliegen kann. Wesentliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es also unter anderem, Oberflächen bereitzustellen, welche zum einen die DNA möglichst irreversibel binden können, zum anderen aber auch unter den in der Bisulfitbehandlung vorliegenden Bedingungen hinreichend stabil bleiben und die DNA weiterhin gebunden halten.

Es wurden zwei Oberflächen identifiziert, die diesen Zweck erfüllen. Zum einen handelt es sich um Aluminiumoxid, zum anderen um C18-Alkylketten, welche in Verbindung mit geeigneten Kationen wie Triethylammoniumionen eine feste Anbindung der DNA erlauben. C18-Alkylketten können durch dem Fachmann bekannte Silanisierungsverfahren mittels einem Octadecyltrialkoxysilan aufgebracht werden. Methoden zur Modifizierung von Oberflächen mit Aluminiumoxid werden unter anderem in US6,291,166 beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern besteht aus den folgenden Teilschritten:

1. Die genomische DNA wird aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden.
2. Die an die Oberfläche gebundene DNA wird, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt.

WO 03/038121

PCT/DE02/04054

14

3. die im zweiten Schritt verwendeten Reagenzien werden in einem Waschschrift entfernt.

4. Ausgewählte Abschnitte der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert und

5. Die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden zusätzlich die folgenden Schritte ausgeführt:

6. Die Reagenzien und Produkte der Polymerasereaktion werden in einem Waschschrift entfernt.

7. Weitere ausgewählte Abschnitte, welche von denen in Schritt d) verschieden sind, der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,

8. Die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Schritte 6-8 mehrmals wiederholt.

Im ersten Verfahrensschritt wird die bevorzugt genomische DNA aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden.

Eine irreversible Bindung in Sinne der vorliegenden Erfindung meint eine Bindung, die mit den üblicherweise zur Verfügung stehenden Mitteln unter den in der Reaktion vorhandenen Bedingungen nicht wieder vollständig gelöst werden kann. Diese Bindung kann bevorzugt eine kovalente

Bindung, eine Ionenpaarbindung oder aber eine Bindung sein, die auf elektrostatischen oder hydrophoben Effekten beruht.

Die Isolierung der DNA erfolgt bevorzugt derart, dass eine Körperflüssigkeit oder aber ein Lysat eines Gewebes mit der Oberfläche kontaktiert wird, die wiederum bevorzugt die DNA irreversibel bindet. Dazu ist im Falle des C18 Materials ein spezieller Puffer erforderlich (beispielsweise Triethylammoniumacetat). Der Überstand wird entfernt und es wird entweder mit Puffer oder Wasser (oder beidem) nachgewaschen, um die nachfolgende Bisulfit Reaktion mit so reinem Ausgangsmaterial wird möglich durchzuführen.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens ist die Bindung der DNA an die Oberfläche kovalent. In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird die DNA unmittelbar in dem Immobilisierungsschritt auch isoliert. Die Isolierung der DNA erfolgt bevorzugt aus Vollblut oder Serum.

In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante erfolgt die Isolierung der DNA aus lysiertem Gewebe. Die Lysis wird besonders bevorzugt mittels Proteinase K durchgeführt.

In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird die Immobilisierung in den Gefäßen einer Mikrotiterplatte mit 96 Gefäßen oder 384 Gefäßen durchgeführt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird die Immobilisierung in PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt,

wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden.

Besonders bevorzugt erfolgt die Immobilisierung der DNA an einem Metalloxid, bevorzugt Aluminiumoxid. In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante erfolgt die Immobilisierung an einem hydrophoben Material und die Bindung ist nur unter den gewählten Pufferbedingungen im wesentlichen irreversibel.

Die zu analysierende DNA wird bevorzugt aus den üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

Im zweiten Schritt des Verfahrens behandelt man die an die Oberfläche gebundene DNA bevorzugt mit Bisulfit, (= Disulfit, Hydrogensulfit) derart, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben.

Wird ein Bisulfitreagenz verwendet, so ist im Falle der C18 Oberfläche Trialkylammoniumbisulfit besonders bevorzugt, um eine feste Anbindung der DNA an die Oberfläche zu gewährleisten. Im Falle der Aluminiumoxidoberfläche wird bevorzugt Natriumbisulfit verwendet.

Die DNA-Probe denaturiert man besonders bevorzugt vor der Behandlung thermisch oder unter Verwendung eines alkalischen Reagenzes wie beispielsweise verdünnter (bevorzugt 0.1 bis 0.3 molarer) Natronlauge.

Wird für die Reaktion Bisulfit verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Für das erfindungsgemäße Verfahren sind zudem bevorzugt ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen.

Dabei kommen als denaturierende Reagenzien oder Lösungsmittel bevorzugt die folgenden Verbindungen oder Verbindungsklassen in Frage:

Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykol-dialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO oder THF. Allerdings ist auch die Einbettung der DNA in Agarose nach der Denaturierung möglich durch Zugabe derselben in gelöster Form und anschliessendes Abkühlen, analog zu der von Olek et al veröffentlichten Methode. Die Agarose kann nach der Bisulfitbehandlung mit heissem Puffer oder Wasser thermisch entfernt.

Die anschließende alkalische Hydrolyse (bevorzugt: Tris Puffer pH 10 oder Ammoniak) führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Bevorzugt wird anschliessend die Desulfonierung der DNA (10-30 min, 90-100 °C) bei alkalischem pH-Wert durchgeführt.

Im dritten Schritt des Verfahrens werden die zuvor verwendeten Reagenzien in einem Waschschrift entfernt. Dabei ist es wiederum entscheidend, dass die immobilisierte, nunmehr chemisch behandelt vorliegende DNA an die Oberfläche gebunden bleibt. Dies ist einfach im Falle einer beispielsweise kovalenten Bindung an die Oberfläche. Dagegen ist wiederum ein entsprechender Puffer erforder-

lich, wenn eine Bindung über beispielsweise Triethylammoniumkationen an eine C18-Phase erfolgt. Dies erfordert dann auch in den Waschsritten einen Puffer, der die Bindung der DNA an die hydrophobe Phase fördert, wie beispielsweise ein Triethylammoniumacetat-Puffer.

Bevorzugt werden mehrere Waschschrte ausgeführt, die besonders bevorzugt aus einem automatisierten Pipettierschritt bestehen, in welchem Wasser oder Puffer zugegeben wird, und aus einem nachfolgenden Pipettierschritt, in dem der jeweilige Puffer oder das Wasser wieder entfernt wird. Dies kommt beispielsweise bei einer Immobilisierung der DNA in einer Mikrotiterplatte und bei Verwendung eines handelsüblichen Pipettierroboters (z. B. von den Firmen Tecan oder Qiagen) zum tragen.

Im vierten Verfahrensschritt werden ausgewählte Abschnitte der immobilisierten, behandelten DNA amplifiziert.

Man amplifiziert die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten wird vorzugsweise in einem Reaktionsgefäß gemacht.

Den Verfahrensschritt kann man auch vorzugsweise in zwei Teilschritten durchführen. Man beginnt mit einer PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, die die vorbehandelte DNA Probe unspezifisch hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein Amplifikat ergeben. Danach führt man eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Sequenz durch, die jeweils zu einem Abschnitt der vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-)-Strang] identisch oder revers kom-

plementär sind und die zu amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird ein Amplifikationsschritt mit mehreren Primerpaaren als Multiplex-PCR ausgeführt. Besonders bevorzugt ist es auch, dass alle oder ein großer Teil der Amplifikate einer immobilisierten DNA Probe gepoolt werden und so gemeinsam einer weiteren Analyse zugeführt werden. Besonders bevorzugt wird die Reaktionsmischung nach der Amplifikation aus dem Reaktionsgefäß, an welches die immobilisierte DNA gebunden ist, entfernt. Damit steht die immobilisierte DNA als Templat für weitere Amplifikationen, bevorzugt wiederum mit zuvor nicht verwendeten Primern, zur Verfügung.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird daher die Amplifikation mehrmals mit unterschiedlichen Primern wiederholt, so dass das Verfahren die folgenden zusätzlichen Schritte aufweist:

- 1) die Reagenzien und Produkte der Polymerasereaktion werden in einem Waschschrift entfernt.
- 2) weitere ausgewählte Abschnitte, welche von den zuvor amplifizierten verschieden sind, der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,
- 3) die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahren werden diese Schritte mehrmals wiederholt, wobei in jeder Amplifikation nach Schritt 2) andere Abschnitte amplifiziert werden als in einer der vorangegangenen Amplifikationen.

Im letzten Verfahrensschritt und auch wenn die obigen zusätzlichen Schritte ausgeführt werden, werden die Amplifikate jeweils hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht. Dadurch kann unmittelbar auf den Methylierungsstatus ausgewählter Cytosinbasen in der DNA-Probe geschlossen werden.

Diese Sequenzanalyse und die nachfolgenden Schlussfolgerungen hinsichtlich des Methylierungsstatus können prinzipiell unter Verwendung vieler, dem Fachmann bekannter Methoden erfolgen, welche auch im Stand der Technik beschrieben sind.

Besonders bevorzugt erfolgt die Analyse durch Hybridisierung der Amplifikate an einen Oligonukleotidarray oder PNA (Peptide Nucleic Acids)-Array.

Es ist weiterhin bevorzugt, dass die Analyse während der Amplifikation durch eine Realtime PCR Methode erfolgt. Besonders bevorzugt ist damit eine Erfindungsvariante, in der von der DNA Extraktion, der Bisulfitbehandlung, der Amplifikation und der Detektion bevorzugt durch Realtime-PCR alle Schritte in einem Reaktionsgefäß ausgeführt werden können. Besonders bevorzugt in diesem Zusammenhang ist auch ein Verfahren, bei dem man die Analyse nach der Amplifikation im gleichen Reaktionsgefäß durch die Aufnahme einer Schmelzkurve durchführt und aus dem Schmelzverhalten auf die Basenzusammensetzung des Fragmentes und damit auf den Methylierungsstatus schließt.

Die Analyse kann auch durch Einbringen der Oberfläche in ein Massenspektrometer erfolgen, welches die Molekülmasse der Amplifikate, von Fragmenten der Amplifikate oder aber von Sonden, die spezifisch an die Amplifikate hybridisieren, bestimmt. Diese Information kann wiederum zur Identifizierung von Sequenzen herangezogen werden, wenn die

Sequenz zum grossen Teil bereits bekannt ist. Es ist auch möglich, die gelösten Amplifikate separat in ein Massenspektrometer einzuführen und die Analyse nach dem Fachmann bekannten Methoden durchzuführen.

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem die Analyse durch allelspezifische Hybridisierung von Oligonukleotiden oder PNAS (Peptide Nucleic Acids) an die zu untersuchenden Positionen in den Amplifikaten erfolgt.

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Analyse durch Hybridisierung von Oligonukleotidprimern und einer nachfolgenden Primerextensionsreaktion oder einer Sequenzierreaktion durchgeführt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Ebenso bevorzugt ist die Verwendung eines Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus einem Reagenz zur Behandlung der DNA, mindestens zwei Primeroligonukleotiden zur Herstellung der Amplifikate, einer Festphase zur Immobilisierung der Proben-DNA, sowie optional weiteren Lösungen und einer Anleitung zur Durchführung mindestens einer der oben beschriebenen Verfahrensvarianten.

Beispiel:

Bisulfit-Behandlung von Promega- und M13-DNA in derivatisierten Reaktionsgefäßen

#### ANBINDUNG DER DNA

Für die Anbindung von DNA auf die mit Aluminiumoxid beschichtete Oberfläche der Reaktionsgefäße wurde EcoRI geschnittene genomische DNA (Promega) und M13 Plasmid-DNA verwendet. Jeweils 160ng wurden in die entsprechenden Reaktionsgefäße pipettiert, mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt, auf einem Shaker kurz gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Gefäße zweimal mit je 50µl Wasser gewaschen. Um die Aktivität der verbleibenden Bindungsstellen auf der Tubeoberfläche herabzusetzen, wurden 10µl einer 5%igen Bovin-Serum-Albumin Lösung hinzu pipettiert, mit 40µl Wasser aufgefüllt und ebenfalls bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Gefäße einmal mit jeweils 50µl Wasser gewaschen.

**BISULFIT-BEHANDLUNG**

Die angebundene DNA wird bei 96°C ohne Zugabe von Wasser für 20 Minuten in einem Eppendorf-Mastercycler denaturiert. Die Gefäße werden alsdann schnellstmöglich entfernt und mit 6µl Dioxan versetzt, wodurch die Denaturierung der DNA erhalten bleibt. Für die Bisulfitreaktion wurden 10µl einer 0.75M Natriumbisulfit-Lösung, 2µl Radikal-fänger (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure, 98,6mg in 1ml Dioxan) und 2µl Wasser zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden bei 50°C in einem Eppendorf-Mastercycler für fünf Stunden inkubiert.

**DESULFONIERUNG**

Nach erfolgter Bisulfitreaktion wurden die Lösungen herauspipettiert und die Gefäße mit 100µl Wasser und, vorbereitend auf die Desulfonierung, mit 100µl einer 50mM Tris-HCl-Lösung gewaschen. Die Desulfonierung erfolgt mit 50µl einer 50mM Tris-HCl-Lösung bei pH9 für 20 Minuten bei 96°C. Nach dreimaligem Waschen mit je 50µl Wasser sind die Reaktionsgefäße einsatzbereit für eine Amplifikation mittels PCR.

**PCR**

Die PCR wurde in einem Maßstab von 25µl angesetzt. Als Primer dienten für die Promega DNA 5'-TAA GTA TGT TGA AGA AAG ATT ATT GTA G-3' und 5'TAA AAA CTA TCC CAT AAT AAC TCC CAA C-3', sowie 5'-ATT ACA AAA TCG CGC AAA-3' und 5'-AAG TCG GAG GTT AAA AAG GT-3' (MWG) für die M13 Plasmid-DNA. Die beiden jeweiligen Primer wurden in einer Lösung mit einer Konzentration von 12.5pmol/µl vorgelegt, 2µl dieser Primerpaarlösung in das entsprechende Tube pipettiert. Für die PCR wurden 2.5µl dNTP-Mix (Fermentas, Konzentration je dNTP 2.5µmol/µl), 0.3µl Hot Star Taq (Qia-

WO 03/038121

24

PCT/DE02/04054

gen), 2.5µl 10x PCR Buffer Solution (Qiagen, 15mMol MgCl<sub>2</sub> im Puffer enthalten) und 17.7µl Wasser (Fluka) pro Ansatz in die Gefäße gegeben.

Die Kontrolle der PCR erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurden 5µl Probe mit 3µl Loading Dye auf ein 1.4% Agarosegel (Eurogentec., Inc.) aufgetragen, als Laufpuffer diente 1xTBE. Die Fragmente wurden mittels Ethidiumbromid angefärbt, das Gel im UV abfotografiert.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt:
  - a) die genomische DNA wird aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden,
  - b) die an die Oberfläche gebundene DNA wird, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,
  - c) die in Schritt b) verwendeten Reagenzien werden in einem Waschschrift entfernt,
  - d) ausgewählte Abschnitte der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,
  - e) die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende zusätzliche Schritte ausführt:
  - f) die Reagenzien und Produkte der Polymerasereaktion werden in einem Waschschrift entfernt,
  - g) weitere ausgewählte Abschnitte, welche von denen in Schritt d) verschieden sind, der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,

h) die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Schritte f)-g) mehrmals wiederholt, wobei in jeder Amplifikation nach Schritt g) andere Abschnitte amplifiziert werden als in einer der vorangegangenen Amplifikationen.
4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung der DNA an die Oberfläche kovalent ist.
5. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die DNA unmittelbar in dem Immobilisierungsschritt auch isoliert.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Isolierung der DNA aus Vollblut oder Serum erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Isolierung der DNA aus lysiertem Gewebe erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die Lysis mittels Proteinase K durchführt.
9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Immobilisierung in den Gefäßen einer Mikrotiterplatte mit 96 Gefäßen oder 384 Gefäßen erfolgt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden.

10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Immobilisierung in PCR-Reaktionsgefäßen erfolgt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden.
11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Immobilisierung der DNA an einem Metalloxid, bevorzugt Aluminiumoxid, erfolgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Immobilisierung an einem hydrophoben Material erfolgt und die Bindung nur unter den gewählten Pufferbedingungen im wesentlichen irreversibel ist.
13. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Amplifikationsschritt mit mehreren Primerpaaren als Multiplex-PCR ausgeführt wird.
14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass alle oder ein großer Teil der Amplifikate einer immobilisierten DNA Probe gepoolt werden und so gemeinsam einer weiteren Analyse zugeführt werden.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dieser weiteren Analyse um die Hybridisierung an einen Oligonukleotidarray oder PNA (Peptide Nucleic Acids)-Array handelt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse während der Amplifikation durch eine Realtime PCR Methode erfolgt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse nach der Amplifikation im gleichen Reaktionsgefäß durch die Aufnahme einer Schmelzkurve erfolgt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse durch allelspezifische Hybridisierung von Oligonukleotiden oder PNAs (Peptide Nucleic Acids) an die zu untersuchenden Positionen in den Amplifikaten erfolgt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse durch Hybridisierung von Oligonukleotidprimern und einer nachfolgenden Primerextensionsreaktion oder einer Sequenzierreaktion erfolgt.
20. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des

Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

21. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
22. Kit, bestehend aus einem Reagenz zur Behandlung der DNA gemäss Anspruch 1b, mindestens zwei Primeroligonukleotiden zur Herstellung der Amplifikate, einer Festphase zur Immobilisierung der Proben-DNA, sowie optional weiteren Lösungen und einer Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem der Ansprüche 1-18.

WO 03/038121

1/2

PCT/DE02/04054

sequenzprotokoll

&lt;110&gt; Epigenomics AG

&lt;120&gt; Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in immobilisierten DNA Proben

&lt;160&gt; 4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 1

taagtatggt gaagaaagat tattgtag 28

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 2

taaaaactat cccataataa ctcccaac 28

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Plasmid DNA

WO 03/038121

2/2

PCT/DE02/04054

<400> 3

attacaaaat cgcgcaaa

18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Plasmid DNA

<400> 4

aagtcggagg ttaaaaaggt

20

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
8. Mai 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/038121 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DI.02/D4054
- (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 2002 (25.10.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 54 317.4 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EPGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt [DE/DE]; Martenlaferweg 4, 14552 Stahnsdorf (DE); BALLHAUSE, Matthias [DE/DE]; Toblacher Strasse 42, 13187 Berlin (DE); GÜTIG, David [DE/DE]; Kastanienallee 74, 10435 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5, 10178 Berlin-Mitte (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht: mit internationalem Recherchenbericht vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 11. Dezember 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF CYTOSINE METHYLATION IN IMMOBILISED DNA SAMPLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN IN IMMOBILISIERTEN DNA PROBEN

(57) Abstract: A method for the detection of cytosine methylation in immobilised DNA samples is disclosed. In the first method step the genomic DNA is isolated from cells or other associated material and bonded essentially irreversibly to a surface. The DNA bonded to the surface is then preferably treated with a bisulphite such that cytosine is converted into a base different from the base pairing relationship in the DNA duplex, whilst 5-methylcytosine remains unaltered. The used reagents are then removed in a washing step. Finally, selected sections of the immobilised DNA are amplified in a polymerase reaction and the amplicate examined with regard to the sequence thereof.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben. Im ersten Verfahrensschritt wird die genomische DNA aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden. Danach wird die an die Oberfläche gebundene DNA bevorzugt mit einem Bisulfitderivat behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt. Anschließend werden die verwendeten Reagenzien in einem Wäscheschritt entfernt. Zuletzt werden ausgewählte Abschnitte der immobilisierten DNA in einer Polymerasereaktion amplifiziert und die Amplicone werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

WO 03/038121 A3

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DE 02/04054
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OLEK A ET AL: "A modified an improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 24, no. 24, 1996, pages 5064-5066, XP002106408 ISSN: 0305-1048 cited in the application abstract page 5064, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 1 page 5064, column 2, paragraph 4 -page 5065, column 1, paragraph 5; figures 1,2 page 5066, column 2, paragraph 2 --- -/-	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles 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 14 October 2003		Date of mailing of the international search report 21/10/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentkanal 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tilkorn, A-C

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/DE 02/04054

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 291 166 B1 (MARMARO JEFFREY M ET AL) 18 September 2001 (2001-09-18) abstract column 3, line 52 -column 4, line 56 column 5, line 62 -column 6, line 22; examples 4,5,11	1-22
A	MYOHANEN S ET AL: "AUTOMATED FLUORESCENT GENOMIC SEQUENCING AS APPLIED TO THE METHYLATION ANALYSIS OF THE HUMAN ORNITHINE DECARBOXYLASE GENE" DNA SEQUENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 5, no. 1, 1994, pages 1-8, XPO01097559 ISSN: 1042-5179 abstract page 2, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 3; figure 1 page 5, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 1 page 6, column 2, paragraph 3 -page 7, column 1, paragraph 5	1-22
A	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, XPO02143106 ISSN: 0305-1048 cited in the application page 2258, column 2, paragraph 2 -page 2261, column 2, paragraph 1; figures 1,2; table 1	1-22
A	WO 00 44934 A (OLEK ALEXANDER ;EPIGENOMICS GMBH (DE)) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document	1-22
A	SHEPHERD M ET AL: "MONITORING OF FLUORESCENCE DURING DNA MELTING AS A METHOD FOR DISCRIMINATION AND DETECTION OF PCR PRODUCTS IN VARIETY IDENTIFICATION" MOLECULAR BREEDING: NEW STRATEGIES IN PLANT IMPROVEMENT, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NL, vol. 4, no. 6, 1998, pages 509-517, XPO01016033 ISSN: 1380-3743 the whole document	16,17

2

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 Information on patent family members

International Application No.  
 PCT/DE 02/04054

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6291166	B1	18-09-2001	US 2002132242 A1 19-09-2002
			AU 745126 B2 14-03-2002
			AU 7127198 A 11-11-1998
			EP 1003908 A1 31-05-2000
			JP 2002512688 T 23-04-2002
			WO 9846797 A1 22-10-1998
WO 0044934	A	03-08-2000	DE 19905082 C1 18-05-2000
			AU 764683 B2 28-08-2003
			AU 3144700 A 18-08-2000
			CA 2359182 A1 03-08-2000
			WO 0044934 A2 03-08-2000
			DE 10080169 D2 24-01-2002
			EP 1147228 A2 24-10-2001
			JP 2002535011 T 22-10-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationale Aktenzeichen PCT/DE 02/04054
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Forschcharakter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	OLEK A ET AL: "A modified an improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 24 Nr. 24, 1996, Seiten 5064-5066, XP002106408 ISSN: 0305-1048 In der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 5064, Spalte 1, Absatz 3 -Spalte 2, Absatz 1 Seite 5064, Spalte 2, Absatz 4 -Seite 5065, Spalte 1, Absatz 5; Abbildungen 1,2 Seite 5066, Spalte 2, Absatz 2 --- -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen:	
<input checked="" type="checkbox"/>	Siehe Anhang Patentfamilie	
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die ein allgemeines Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angezogen ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angezogen ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nachvollziehbar ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abschließendes Datum des internationalen Recherchenberichts	
14. Oktober 2003	21/10/2003	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2000, Tx: 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bevollmächtigter Tilkorn, A-C	

Formblatt PCT/ISA210 (Blatt 2) (Juli 1999)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationaler Aktenzeichen  
 PCT/DE 02/04054

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	US 6 291 166 B1 (MARMARO JEFFREY M ET AL) 18. September 2001 (2001-09-18) Zusammenfassung Spalte 3, Zeile 52 -Spalte 4, Zeile 56 Spalte 5, Zeile 62 -Spalte 6, Zeile 22; Beispiele 4,5,11	1-22
A	MYOHANEN S ET AL: "AUTOMATED FLUORESCENT GENOMIC SEQUENCING AS APPLIED TO THE METHYLATION ANALYSIS OF THE HUMAN ORNITHINE DECARBOXYLASE GENE" DNA SEQUENCE, NEW YORK, NY, US, Bd. 5, Nr. 1, 1994, Seiten 1-8, XPO01097559 ISSN: 1042-5179 Zusammenfassung Seite 2, Spalte 1, Absatz 3 -Spalte 2, Absatz 3; Abbildung 1 Seite 5, Spalte 1, Absatz 1 -Spalte 2, Absatz 1 Seite 6, Spalte 2, Absatz 3 -Seite 7, Spalte 1, Absatz 5	1-22
A	REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 26, Nr. 10, 1998, Seiten 2255-2264, XPO02143106 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt Seite 2258, Spalte 2, Absatz 2 -Seite 2261, Spalte 2, Absatz 1; Abbildungen 1,2; Tabelle 1	1-22
A	WO 00 44934 A (OLEK ALEXANDER ;EPIGENOMICS GMBH (DE)) 3. August 2000 (2000-08-03) das ganze Dokument	1-22
A	SHEPHERD M ET AL: "MONITORING OF FLUORESCENCE DURING DNA MELTING AS A METHOD FOR DISCRIMINATION AND DETECTION OF PCR PRODUCTS IN VARIETY IDENTIFICATION" MOLECULAR BREEDING: NEW STRATEGIES IN PLANT IMPROVEMENT, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NL, Bd. 4, Nr. 6, 1998, Seiten 509-517, XPO01016033 ISSN: 1380-3743 das ganze Dokument	16,17

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

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen,

soweit Patentfamilie gehören

Informationskennzeichen

PCT/DE 02/04054

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6291166	B1	18-09-2001	US 2002132242 A1	19-09-2002
			AU 745126 B2	14-03-2002
			AU 7127198 A	11-11-1998
			EP 1003908 A1	31-05-2000
			JP 2002512688 T	23-04-2002
			WO 9846797 A1	22-10-1998
WO 0044934	A	03-08-2000	DE 19905082 C1	18-05-2000
			AU 764683 B2	28-08-2003
			AU 3144700 A	18-08-2000
			CA 2359182 A1	03-08-2000
			WO 0044934 A2	03-08-2000
			DE 10080169 D2	24-01-2002
			EP 1147228 A2	24-10-2001
			JP 2002535011 T	22-10-2002

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI, GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,N Z,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 バルハウゼ, マティアス

ドイツ国、13187 ベルリン、トートラッヒャー シュトラーセ 42

(72)発明者 ギューティク, ダーヴィト

ドイツ国、10435 ベルリン、カスタンニーンアレー 74

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA03 CA20 HA14 HA20

4B063 QA13 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QR08 QR16 QR50 QR55 QR62

QR82 QS11 QS13 QS25 QX02

专利名称(译)	检测固定化DNA样品中胞嘧啶甲基化的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005506850A</a>	公开(公告)日	2005-03-10
申请号	JP2003540386	申请日	2002-10-25
[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	ベルリンクルト バルハウゼマティアス ギューテイクダーヴィト		
发明人	ベルリン,クルト バルハウゼ,マティアス ギューテイク,ダーヴィト		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6827 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6827 C12Q2565/518 C12Q2531/113 C12Q2523/125		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA03 4B024/CA20 4B024/HA14 4B024/HA20 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR16 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS11 4B063/QS13 4B063/QS25 4B063/QX02		
优先权	10154317 2001-10-26 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种用于分析基因组DNA样品中的胞嘧啶甲基化样品的方法和如上所述的方法，包括对患者或每个个体进行以下治疗，用于诊断和/或初步诊断不良症状和可使用上述方法用于诊断和/或初步诊断的试剂盒。将基因组DNA样品与细胞或与其相关的其他物质分离，并且基本上和不可逆地结合到表面，并且结合到表面的DNA被在DNA双链体中具有不同碱基对行为的碱基取代。变化，而作为5-甲基胞嘧啶保持不变，优选的是，用重亚硫酸盐处理（二亚硫酸盐，亚硫酸氢盐），它是通过洗涤所使用的处理剂去除，固定它被制成通过聚合酶反应扩增选定的DNA片段，并研究扩增产物的序列。