

(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2004-516821

(P2004-516821A)

(43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	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 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 2 G O 5 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 2 4
G O 1 N 21/78	G O 1 N 21/78	C 4 B O 2 9
G O 1 N 27/62	G O 1 N 27/62	V 4 B O 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 81 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-522537 (P2002-522537)	(71) 出願人	500247105
(86) (22) 出願日	平成13年9月1日 (2001.9.1)		エビゲノミクス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成14年3月5日 (2002.3.5)		ドイツ国、デー-10435 ベルリン、
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/010074		カスターニアンアレー 24
(87) 国際公開番号	W02002/018632	(74) 代理人	100093735
(87) 国際公開日	平成14年3月7日 (2002.3.7)		弁理士 荒井 鐘司
(31) 優先権主張番号	100 43 826.1	(74) 代理人	100105429
(32) 優先日	平成12年9月1日 (2000.9.1)		弁理士 河野 尚孝
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100108143
(31) 優先権主張番号	100 44 543.8		弁理士 嶋崎 英一郎
(32) 優先日	平成12年9月5日 (2000.9.5)	(72) 発明者	オレク, アレクサンダー
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ国、デー-10115 ベルリン、
			シュレンダーシュトラッセ 13

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲノムDNA上の、配列コンテキスト5-CpG-3内の特定シトシンのメチル化度の定量方法

## (57) 【要約】

本発明は、ゲノムDNA試料中の配列コンテキスト5'-CpG-3'における、特定のシトシンのメチル化度の定量方法に関する。

【解決手段】ゲノムDNA試料の配列コンテキスト5'-CpG-3'にある特定のシトシンのメチル化度を検出する方法である。第1段階ではゲノムDNAが化学的に処理されるので、シトシン塩基はウラシルに変換されるが、5-メチルシトシン塩基は変換されない。次いで、前記特定のシトシンを含むゲノムDNAの一部が増幅され、その際、増幅産物は実証し得る標識を施され、次の段階で、2種類のオリゴヌクレオチッドへの増幅産物のハイブリッド形成の程度が、増幅産物の標識検出によって決められ、ハイブリッド形成の結果、2種類のオリゴヌクレオチッド上に検出される標識の割合から、ゲノムDNAにおける前記特定のシトシンのメチル化度を推定する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ゲノム DNA 試料の配列コンテキスト 5 - CpG - 3 にある特定のシトシンのメチル化度を検出する方法であって、a) ゲノム DNA を化学的に処理することにより、シトシン塩基をウラシルに変換する一方、5 - メチルシトシン塩基を変換しない、b) 前記特定のシトシンを含むゲノム DNA の一部を増幅し、増幅産物が実証可能な標識を含むようにし、c) 増幅産物を 2 種類のオリゴヌクレオチド及び/または PNA オリゴマーの少なくとも 1 種類に結合するように、ハイブリッド形成させ、d) 増幅産物が 2 種類のオリゴヌクレオチド及び/または PNA オリゴマー上にハイブリッド形成している量を、増幅産物の標識を検出することで同定し、e) ハイブリッド形成の結果、2 種類のオリゴヌクレオチド及び/または PNA オリゴマー上に検出される標識の割合から、ゲノム DNA における前記特定シトシンのメチル化度を推定することを特徴とする、メチル化度の検出方法。

10

## 【請求項 2】

c) において、増幅産物を 2 種類のオリゴマー（オリゴヌクレオチド及び/または PNA オリゴマー）の少なくとも 1 種類に結合するようにハイブリッド形成させ、第 1 のオリゴマーが、前記特定シトシンがゲノム DNA 中でメチル化されているならば、ゲノム DNA を化学的に処理して得られる DNA 配列と優先的にハイブリッド形成するようにし、第 2 のオリゴマーが、前記特定シトシンがゲノム DNA 中でメチル化されていないならば、ゲノム DNA を化学的に処理して得られる DNA 配列と優先的にハイブリッド形成される請求項 1 に記載のメチル化度の検出方法。

20

## 【請求項 3】

c) において、増幅産物を 2 種類のオリゴマー（オリゴヌクレオチド及び/または PNA オリゴマー）の少なくとも 1 種類に結合するようにハイブリッド形成させ、第 1 のオリゴマーは、前記特定シトシンがゲノム DNA 中でメチル化されているならば、ゲノム DNA を化学的に処理して得られる DNA 配列と優先的にハイブリッド形成するようにし、配列には優先度を下げ、第 2 のオリゴマーは前記特定シトシンがゲノム DNA 中でメチル化されていないならば、ゲノム DNA を化学的に処理して得られる DNA 配列と優先的にハイブリッド形成され、第 2 のオリゴマーは、増幅産物に本質的に、前記ゲノム DNA 中の特定のシトシンのメチル化度に依存せずに、ハイブリッド形成される請求項 1 に記載のメチル化度の検出方法。

30

## 【請求項 4】

c) において、増幅産物を 2 種類のオリゴマー（オリゴヌクレオチド及び/または PNA オリゴマー）の少なくとも 1 種類に結合するようにハイブリッド形成させ、第 1 のオリゴマーは、前記特定シトシンがゲノム DNA 中でメチル化されていないならば、ゲノム DNA を化学的に処理して得られる DNA 配列と優先的にハイブリッド形成するようにし、配列には優先度を下げ、第 2 のオリゴマーは、前記特定シトシンがゲノム DNA 中でメチル化されているならば、ゲノム DNA を化学的に処理して得られる DNA 配列と優先的にハイブリッド形成され、第 2 のオリゴマーは増幅産物に本質的に、前記ゲノム DNA 中の特定のシトシンのメチル化度に依存せずに、ハイブリッド形成される請求項 1 に記載のメチル化度の検出方法。

40

## 【請求項 5】

ゲノム DNA 試料に対してのみならず、同様にして、前記特定シトシンがメチル化されているのではなく、むしろメチル化されていない標準 DNA に対して用い、請求項 1 に記載のメチル化されていない DNA を用いて測定した際に 2 種類のオリゴヌクレオチド上に検出される標識の割合をメチル化度 0 の標準値として用い、同様にして、請求項 1 に記載のメチル化されている標準 DNA を用いて測定することにより、2 種類のオリゴヌクレオチド上に検出される標識の割合をメチル化度 1 の標準値として用い、これらの標準値をゲノム DNA 試料のメチル化度の同定に採用することを特徴とする、請求項 1 乃至 4 の何れか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

## 【請求項 6】

50

前記特定のシトシンのメチル化度として任意の、既知の値を示す多くの標準DNA試料を、標準値の補正に使用することを特徴とする、請求項5に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項7】

標準として使用されるDNAが、互いに異なる標識であり、試料（請求項1のゲノムDNAからの増幅生産物により製造される）が異なる標識を備えた試料であることを特徴とする請求項5または6に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項8】

異なるゲノム試料から得られる増幅産物が異なる標識を備えていることを特徴とする請求項1～7の何れか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項9】

同一のゲノム試料から得られる、区別された標識を備えた増幅産物が、異なる検出方法から得られる値の精度を高めることを達成するために、区別された標識を備えていることを特徴とする請求項1～8の何れか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項10】

前記標識が蛍光標識であることを特徴とする請求項1～9の何れか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項11】

化学的処理に亜硫酸塩（＝亜硫酸水素塩，酸性亜硫酸塩）の溶液を用いることを特徴とする、請求項1～10の何れか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項12】

増幅のために、オリゴヌクレオチドが使用され、このオリゴヌクレオチドは配列ID1から配列ID40712に相当する化学前処理されたDNAの少なくとも18個の塩基配列片であることを特徴とする請求項1～11の何れか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項13】

ハイブリッド形成の過程でオリゴヌクレオチド及び／またはPNAオリゴマーが使用され、これらは配列ID1から配列ID40712に相当する化学前処理されたDNAの少なくとも9個の塩基配列片にハイブリッド形成されるか、または、これらに対応しており、塩基配列は少なくとも1個のCpGジヌクレオチドを含み、これはオリゴマーの約1/3の量、存在することを特徴とする請求項1～12の何れか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項14】

前記標識が化学発色、紫外線吸収、あるいは蛍光分極を用いて検出されることを特徴とする、請求項1から13のいずれか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項15】

標識に放射性核種を用いることを特徴とする、請求項1から13のいずれか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項16】

標識として、質量分析装置で検出可能な、分離可能な質量標識を用いることを特徴とする、請求項1から13のいずれか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項17】

PCR産物の全体を、あるいは、その特徴的な断片のみを質量分析装置で検出し、これにより、その質量を基に明確な結果を得る、請求項1から13のいずれか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項18】

オリゴマー（オリゴヌクレオチド及び／またはPNAオリゴマー）が5'-CG-3'配列を含むことを特徴とする、請求項1から17のいずれか1項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項19】

オリゴマー（オリゴヌクレオチド及び／またはPNAオリゴマー）が5'-TG-3'配列、及び／または5'-CA-3'配列を含むことを特徴とする、請求項1から18のい

10

20

30

40

50

ずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 20】

第 1 のオリゴマー（オリゴヌクレオチド及び／または P N A オリゴマー）が 5' - C G - 3' 配列を含み、第 2 のオリゴマーが 5' - T G - 3' 配列及び／または 5' - C A - 3' 配列を含むことを特徴とする、請求項 18 または 19 に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 21】

第 1 と第 2 の種類のオリゴヌクレオチドが共通の固体相に固定されていることを特徴とする、請求項 1 ～ 20 の何れか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 22】

オリゴヌクレオチドが直角または六角形の網目上の平らな固体相に配列され、特定のオリゴヌクレオチドの固体相上の位置が、それぞれの配列と関連づけられていることを特徴とする請求項 11 に記載のメチル化度の検出方法。 10

【請求項 23】

第 1 と第 2 のオリゴマーが塩類から分離した、コード化された標識であるビーズ上に固定されている請求項 1 ～ 20 の何れか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 24】

請求項 1 の b) 段階を以下に述べるように 2 つの段階に分けて実施することを特徴とする請求項 1 ～ 23 の何れか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

a) 請求項 1 に従って前処理された D N A 試料に非特異的にハイブリッド形成し、更に、P C R 段階で一つ以上の増幅産物を生ずる、異なる配列を有する、少なくとも、一対のプライマーを用いた P C R 準備増幅と 20

b) 請求項 1 に従って前処理された D N A 試料 [ ( + ) - 鎖あるいは ( - ) - 鎖 ] の一片と同じであるか、または逆に相補的であり、増幅される D N A に特異的にハイブリッド形成する、異なる配列のプライマーを有する、準備増幅において生じた産物の P C R 増幅。

【請求項 25】

多数の D N A 断片の増幅を単一の反応容器内で実行することを特徴とする、請求項 1 から 24 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 26】

増幅に耐熱性の D N A 複製酵素を用いることを特徴とする、請求項 1 から 25 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。 30

【請求項 27】

増幅に使用されるプライマー・オリゴヌクレオチドが T、A、C 塩基だけ、あるいは T、A、G 塩基だけを含むことを特徴とする、請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 28】

異なる配列コンテキスト上の少なくとも 10 の C p G 位置を同時に分析できることを特徴とする、請求項 1 から 27 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 29】

異なる配列コンテキスト上の少なくとも 50 の C p G 位置を同時に分析できることを特徴とする、請求項 1 から 28 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。 40

【請求項 30】

異なる配列コンテキスト上の少なくとも 100 の C p G 位置を同時に分析できることを特徴とする、請求項 1 から 29 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 31】

異なる配列コンテキスト上の少なくとも 500 の C p G 位置を同時に分析できることを特徴とする、請求項 1 から 30 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 32】

異なる配列コンテキスト上の少なくとも 1000 の C p G 位置を同時に分析できることを特徴とする、請求項 1 から 31 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 33】

例えば、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房、肝臓などから得て、これをパラフィンに封入した細胞系列、血液、喀痰、糞便、尿、脳 - 脊髄液などの、組織、組織学的標本、または、これらの可能な混合物から、ゲノム DNA 試料を得る、請求項 1 から 32 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 34】

少なくとも、下記の領域に属する患者及び通常の健常者の好ましくない症状についての診断及び／または推測のために、請求項 1 ～ 33 に記載の方法の使用であって、その領域が、薬害；癌；CNS - 機能欠陥、障害、疾患；侵害徴候または挙動錯乱；脳障害の臨床的、心理的、社会的徴候；精神障害、人格障害；老年性痴呆及び／または複合的徴候；心臓血管についての疾患、機能欠陥、障害；胃腸系統の疾患、機能欠陥、障害；呼吸器系統の疾患、機能欠陥、障害；傷害、炎症、感染、免疫及び／または病気回復期；発育期における生育の逸脱、偏向、遅滞などの身体の疾患、機能欠陥、障害；皮膚の疾患、障害；筋肉、結合組織または骨の機能欠陥、障害、疾患；内分泌、代謝の機能不全、障害、疾患；頭痛、性的機能不全である方法の使用。

10

【請求項 35】

細胞種別あるいは組織の識別のため、あるいは、細胞分化の研究のために、請求項 1 から 34 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法。

【請求項 36】

重亜硫酸塩を含有する試薬、増幅産物合成のためのプライマー・オリゴヌクレオチド、及び／または、請求項 10 に従って固体相に固定されたオリゴヌクレオチド、更に、請求項 1 から 35 のいずれか 1 項に記載のメチル化度の検出方法を行うための説明書、を含むキット。

20

【請求項 37】

配列 ID 1 から配列 ID 40712 に相当する、化学前処理された DNA の少なくとも 18 個の塩基配列片を含有することを特徴とする核酸。

【請求項 38】

化学的に前処理された DNA（配列 ID 1 から配列 ID 40712）にハイブリッド形成される、少なくとも 9 個のヌクレオチドの塩基配列長を含有する、化学的に前処理された DNA におけるシトシンメチル化状態を検出するオリゴマー（オリゴヌクレオチドまたは PNA オリゴマー）。

30

【請求項 39】

少なくとも 1 個の CpG ジヌクレオチドを含有する請求項 38 に記載のオリゴマー。

【請求項 40】

CpG ジヌクレオチドのシトシンがオリゴマーの約 3 分の 1 量であることを特徴とする請求項 39 に記載のオリゴマー。

【請求項 41】

ID 1 から ID 40712 の配列の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチド毎に 1 つのオリゴマーを少なくとも含有する請求項 39 に記載のオリゴマーの一群。

【請求項 42】

ID 1 から ID 40712 の配列の CpG ジヌクレオチド毎に 1 つのオリゴマーを含有する請求項 41 に記載のオリゴマーの一群。

40

【請求項 43】

請求項 1 に記載の増幅用原料のプライマー・オリゴヌクレオチドとして、ID 1 から ID 40712 の配列の少なくとも 1 つ、またはその断片として組み込まれるところの、少なくとも 2 つの核酸の組。

【請求項 44】

少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドが 1 つの固体相に結合していることを特徴とする請求項 43 に記載のオリゴヌクレオチドの組。

【請求項 45】

シトシンのメチル化度及び／または、ID 1 から ID 40712 の配列の 1 つにあたる、

50

化学的に前処理されたゲノムDNAにおける単一ヌクレオチド - ポリモルフィズム (SNPs) の検出用の1組のオリゴマーが請求項38~40のいずれか1項に記載の少なくとも10個のオリゴマーを含有すること。

【請求項46】

ID1からID40712の配列のCpGジヌクレオドの、それに起因して疾病が発生するメチル化度の分析用の異なるオリゴマー (Array) の担体上に固定された配列の整列法であって、請求項2~4の何れか1項に記載の、少なくとも1つのオリゴマーが1つの固体相に接続される方法。

【請求項47】

請求項38~40の何れか1項に記載の、異なるオリゴマー (Array) の配列が1つの固体相に結合される方法。 10

【請求項48】

直角または六角形の網目上の平らな固体相上に配列されていることを特徴とする、請求項47記載の互いに異なるオリゴマーの配列 (Array) 及び/またはPNAオリゴマー。

【請求項49】

固体相表面がシリカ、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、鋼、鉄、銅、ニッケル、銀、金からなることを特徴とする請求項47または請求項48に記載の配列 (Array) 。

【請求項50】

遺伝子に起因する疾病に関連するメチル化度の分析用のDNA及び/またはPNA-Array、である請求項38~40の何れか1項に記載の、少なくとも1つの核酸。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ゲノムDNA試料中の配列コンテキスト5'-CpG-3'における、特定のシトシンのメチル化度の検出方法に関する。

【0002】

近年、分子生物学的方法が発達するにともない、遺伝子それ自体、RNA内の遺伝子の翻訳、およびその結果生じる蛋白質などが、詳しく研究されている。個体が発達する間に、どの遺伝子が発現されているか、特定の細胞や組織のある遺伝子がどのように活性化され、あるいは抑制されているかは、遺伝子あるいはゲノムのメチル化の程度や特性と関連している。この意味で、病因となる状態は、個々の遺伝子あるいはゲノムのメチル化様式の変化に反映されているという仮説は説得力を持っている。 30

【0003】

本発明は、与えられたDNA試料中の多数のシトシン塩基の5位がメチル基によって、どのように修飾されているかをハイブリッド形成 (相補結合) を用いて同時に分析することを可能とする方法である。更に、本発明における発症している病気の診断や病気の前駆症状を発見する方法に核酸、オリゴヌクレオチド及びPNAオリゴマーが有用である。

【0004】

5-メチルシトシンは有核細胞のDNAの中で、共有結合で修飾された塩基として、頻繁に存在する。例えば、転写の制御、ゲノム・インプリンティングや腫瘍発症に関与している。それゆえ、遺伝情報の現状としての5-メチルシトシンの把握には、多大の関心が寄せられている。しかし、5-メチルシトシンの位置はシーケンシング (配列解析) によっては同定できず、5-メチルシトシンはハイブリッド形成ではシトシンと同じ結果をもたらす。従って、どのシトシンが5-メチルシトシンとなっているかという発生機制的な情報はPCR増幅では完全に見落としてしまう。 40

【0005】

CpG島のメチル化は、しばしば転写不活性と同一視される。CpG島が遺伝子のプロモーター中に存在するようという、一義的指示が出されるが、全てのCpG島及びメチル化の部位は既知のプロモーター中に偏在しない。種々の、特異的な、印刷遺伝子ではCp 50

G 島は、かなりの距離を置いて、転写開始の方向に、上流に、偏在する。そして、多くの遺伝子は多段階プロモーターを有する。多数の発症例についてCpGジヌクレオチドのメチル化が原因であると指摘されている。古典的突然変異で、DNAのメチル化で、遺伝子のコードされた機能を変えることなしに塩基置換を書込む機能が問題となる。これら漸生説的修飾と古典的突然変異の間の交換は腫瘍遺伝子においては重要な役割を演ずる。例えば、病巣の過度のメチル化と一般的なゲノムメチル化は多くの異なる腫瘍の標識となる。腫瘍発生と腫瘍進行は過度のメチル化で誘発される変異原性及び他の、細胞増殖及び/または発生学的展開に必要な脱メチルにより制御される遺伝子の遮断、遺伝子の誘発される活性化、により惹起される。

#### 【0006】

遺伝性で、非ポリープ性のコロレクター腫瘍では、例えば、変異陰性の大腸癌の大部分のケースは、hMLH1プロモーターの過剰なメチル化及びhMLH1の接続的、非発現、一つの対の欠損の修復に起因する(Bevilacqua RA, Simpson AJ, . Methylation of the hMLH1 promotor but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. Int J Cancer. 2000 Jul 15; 87(2): 200~3)。

肺癌の発症においては、発現の損失がRAS活性同族体の配列プロモーターにおけるCpG島のメチル化と相関している[Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP, Nucleotide. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. Nat Genet. 2000 Jul; 25(3): 315~9]。

LKB1腫瘍抑制遺伝子の新生の、プロモーターの過度のメチル化を含む、不活性化はPeutz-Jeghers症候を含む[Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, Lothe RA, Baylin SB, Aaltonen LA, Herman JG, Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. Oncogene 2000 Jan 6; 19(1): 164~8]。

#### 【0007】

メチル化が関与する多くの発症は、その病因において、腫瘍抑制遺伝子p16またはp15と密接な関係があることを示している。それで、マイコソポリープとp16(INK4a)遺伝子の間の関係が認められている[Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, Martinez P, Garcia C, Gomez E, Rodriguez JL, Garcia D, Vanaclocha F, Iglesias L, Piris MA, Algara P, p16(INK4a) gene alterations are frequent in lesions of mycosis fungoides. Am. J Pathol. 2000 May; 156(5): 1565~72]。

胃癌のp16遺伝子の転写の遮断と僅かな特殊なCpGの位置の間の強い相関から出発している[Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ, Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16(INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. Int J Cancer. 2000 Jul 15; 87(2): 236~40]。

#### 【0008】

一次的硬化性の胆管炎と関連がある胆管癌の発症は、p 1 6 プロモーターに依存する、p 1 6 腫瘍抑制遺伝子の不活性化による。[ Ahrendt S A , Eisenberger C F , Yip L , Rashid A , Chow J T , Pitt H A , Sidransky D , Chromosome 9 p 2 1 loss and p 1 6 inactivation in primary sclerosing cholangitis - associated cholangiocarcinoma . J Surg Res . 1 9 9 9 Jun 1 ; 8 4 ( 1 ) : 8 8 ~ 9 3 ]。

#### 【 0 0 0 9 】

白血病遺伝子及び急性白血病の進行では p 1 6 遺伝子の過度メチル化による不活性化が一つの役割を演じる [ Nakamura M , Sugita K , Inukai T , Goi K , Iijima K , Tezuka T , Kojika S , Shiraishi K , Miyamoto N , Karakida N , Kagami K , O - Koyama T , Mori T , Nakazawa S , p 1 6 / M T S 1 / I N K 4 A ] 遺伝子はしばしば、1 1 q 2 3 転位を伴う小児の急性白血病における過度のメチル化によって不活性化される。1 9 9 9 Jun 1 3 ; ( 6 ) : 8 8 4 ~ 9 0 ]。

10

#### 【 0 0 1 0 】

更に、p 1 6 及び p 1 5 遺伝子の過度のメチル化が骨髓性白血病の腫瘍遺伝子で決定的な役割を演じていることが自明のこととされている [ Ng M H , Wong I H , Lo K W , DNA methylation changes and multiple myeloma . Leuk Lymphoma . 1 9 9 9 Aug ; 3 4 ( 5 ~ 6 ) : 4 6 3 ~ 7 2 ]。腎臓癌の発生原因に不活性 V H L - 遺伝子のメチル化が重要な役割を演じている [ Glavac D , Ravnik - Glavac M , Ovcak Z , Maser A , Genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma ( RCC ) . Pflugers Arch . 1 9 9 6 ; 4 3 1 ( 6 Suppl 2 ) : R 1 9 3 ~ 4 ]。

20

#### 【 0 0 1 1 】

5 ' - C p G 島の異常なメチル化は鼻咽腔癌の p 1 6 遺伝子転写不活性化に関与し得る [ Lo K W , Cheung S T , Leung S F , van Hasselt A , Tsang Y S , Mak K F , Chung Y F , Woo J K , Lee J C , Huang D P , Hypermethylation of the p 1 6 gene in nasopharyngeal carcinoma . Cancer Res . 1 9 9 6 Jun 1 5 ; 5 6 ( 1 2 ) : 2 7 2 1 ~ 5 ]。肝細胞癌では、p 1 6 蛋白質の不活性化が指摘され、メチル化プロモーター及び同遺伝質欠失はここでは、よく起こるメカニズムである [ Jin M , Piao Z , Kim N G , Park C , Shin E C , Park J H , Jung H J , Kim C G , Kim H , p 1 6 は肝細胞癌における主要な不活性化ターゲットである。Cancer 2 0 0 0 Jul 1 ; 8 9 ( 1 ) : 6 0 ~ 8 ]。

30

#### 【 0 0 1 2 】

遺伝子発現の制御としてのメチル化は乳癌の B R C A 1 遺伝子であると報告されている [ Magdinier F , Billard L M , Wittmann G , Frappart L , Benchai M , Lenoir G M , Guerin J F , Dante R , B R C A 1 の 5 ' 末端 C p G 島の部分的メチル化は体細胞の遺伝子発現の抑制に関連する。FASEB J . 2 0 0 0 Aug ; 1 4 ( 1 1 ) : 1 5 8 5 ~ 9 4 ]。メチル化と非ホジキン氏リンパ腫との相関が認められている [ Martinez - Delgado B , Richart A , Garcia M J , Robledo M , Osorio A , Cebrían A , Rivas C , Benítez J , 非ホジキン氏リンパ腫の追跡における疾病標識としての p 1 6 i n k 4 a 及び p 1 5 i n k 4 b 遺伝子の過メチル化、B r J . Haematol . 2 0 0 0 Apr ; 1 0 9 ( 1 ) : 9 7 ~ 1 0 3 ]。

40

#### 【 0 0 1 3 】

C p G のメチル化は C D K N 2 A 遺伝子の発現低下に関連する T 細胞白血病の進行を惹起する、[ Nosaka K , Maeda M , Tamiya S , Sakai T , Mits

50



uya H, Matsuo M, CDKN2Aの遺伝子のメチル化の増加は成人T細胞白血病の進行に関連する。Cancer Res. 2000 Feb 15; 60(4): 1043~8]。

#### 【0014】

[Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, Nichols PW, Jones PA, 膀胱癌のCpG島の新たなメチル化における進行的増加。Cancer Res. 2000 May 1; 60(9): 2473~6]。食道扁平細胞癌の転移不活性化は、その疾病の進行に影響を与えるFHIT遺伝子のメチル化と関連する[Shimada Y, Sato F, Watanabe G, Yamasaki S, Kato M, Maeda M, Imamura M, 壊れやすいヒスチジン3つ組遺伝子の発現ロスは食道扁平細胞癌の進行と関連するが、これは患者の予後や喫煙歴とは無関係である。Cancer. 2000 Jul 1; 89(1): 5~11]。

10

#### 【0015】

中性の蛋白質分解酵素24.11(NEP)は男性ホルモンに依存しない前立腺癌の増殖に關与する神経蛋白質の増殖を不活性化する。NEPプロモーターの過メチル化による、NEP発現のロスは神経蛋白質に刺激される男性ホルモンに依存しない前立腺癌の発生を助長する[Usmani BA, Shen R, Janeczko M, Papandreou CN, Lee WH, Nelson WG, Nelson JB, Nanus DM, ヒトの前立腺癌の中性蛋白質分解酵素の遺伝子プロモーターのメチル化。Clin Cancer Res. 2000 May; 6(5): 1664~70]。

20

#### 【0016】

発生途上の副腎皮質癌は腫瘍DNAの異常構造を示す。この異常構造は、IGF2遺伝子の過発現下で、この座で、DNAの脱メチル化と相関する[Wilkin F, Gagne N, Paquette J, Oligny LL, Deal C, 小児性副腎皮質腫瘍：インシュリン類似成長因子II遺伝子の過発現、J Clin Endocrinol Metab. 2000 May; 85(5): 2048~56. Review]。網膜芽腫DNAで多くのポリヌクレオチッド配列のメチル化が発病に關与していることが認められている、[Mancini D, Singh S, Ainsworth P, Rodenhiser D, 網膜芽腫遺伝子(RB1)の突然変異としてのメチル化CpGジヌクレオチッド。Am J Hum Genet. 1997 Jul; 61(1): 80~7]。

30

#### 【0017】

慢性骨髓性白血病の場合はp53遺伝子とメチル化見本の間で、発病が速くなることとの関連が推定されている。[Guinn BA, Mills KI, 慢性骨髓性白血病進行における、p53突然変異、メチル化及びゲノム安定性。Leuk Lymphoma. 1997 Jul; 26(3~4): 211~26]。また、急性骨髓性白血病の場合はメチル化との関連性が実証されている[Melki JR, Vincent PC, Clark SJ, 急性骨髓性白血病における多段遺伝子のDNA過メチル化の現状、Cancer Res. 1999 Aug 1; 59(15): 3730~40]。

#### 【0018】

ウィルムス腫瘍(幼児期の腎臓の腫瘍)のサプレッサー遺伝子における腫瘍特異性のメチル化の位置が同定された[Kleymenova EV, Yuan X, LaBate ME, Walker CL, ウィルムス腫瘍のサプレッサー遺伝子における腫瘍特異性のメチル化の位置の同定、Oncogene 1998 Feb 12; 16(6): 713~20]。パーキットリンパ種では2、3のプロモーターが完全なCpGメチル化を示す[Tao Q, Robertson KD, Manns A, Hildesheim A, Ambinder RF, パーキットリンパ種におけるEBウィールス(EBV): 初期腫瘍膜、血液の分子的分析。1998 Feb. 15; 91(4): 1373~81]。甲状腺癌では、DNAメチル化がある役割を演じることが認められている[Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB, : 脱分化された甲状

40

50

腺癌におけるヨード摂取の回復、ヒト  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter 遺伝子のメチル化状態への関係、*J. Clin. Endocrinol Metab*, 1999 Jul; 84(7): 2449~57]。

#### 【0019】

メチル化が関連するのは癌の発症だけではなく、多くの、癌以外の発症にも関連する。炎症性関節炎の研究では、この病気の発症が、ゲノムDNAのメチル化と関連することが指摘されている [Kim YI, Logan JW, Mason JB, Roubenoff R, 炎症性関節炎におけるDNAの低メチル化: *J Lab Clin Med*. 1996 Aug; 128(2): 165~72]。ICF症候にはメチル化の制御発現の関連が指摘されている [Kondo T, Bobek MP, Kuick R, Lamb B, Zhu X, Narayan A, Bourc'his D, Viegas-Pequignot E, Ehrlich M, Hanash SM, ICF症候における全ゲノムメチル化スキャン: 非附随体DNAリピートD4Z4及びNBL2の低メチル化]。全身の皮膚結核エリテマトースへのメチル化の関与が推定され [Vallin H, Perers A, Alm GV, Ronnblom L, 全身の皮膚結核エリテマトースの偽IFN- $\gamma$ インデューサー結合における対二重鎖DNA、対身及び免疫刺激性プラスミドDNA、*J Immunol*. 1999 Dec 1; 163(11): 6306~13]、筋ジストロフィー症とCpG島の間の関連も推定されている [Banerjee S, Singh PB, Raspberry C, Cattanach BM, Embryonic inheritance of the chromatin organisation of the imprinted H19 domain in mouse spermatozoa. *Mech Dev*. 2000 Feb; 90(2): 217~26; Burmeister M, Lehrach H, *Natur* 1986 Dec; 324(6097): 582~5]。

#### 【0020】

発症の形成に関与する、蛋白質前駆アミロイドメチル化の効果はアルツハイマーの発症によると推定される [West RL, Lee JM, Maroun LE Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci*. 1995; 6(2): 141~6]。また、メチル化の状態は染色体レベルで重要な役割を演じる。例えば、染色体Xの脆弱性と結合する精神的遅延症候では、染色体の脆弱性の程度はメチル化によって決まる [de Munia in AL, Cobo AM, Poza JJ, Saenz A, (DNAの不安定に起因する疾病) *Neurologia*. 1995, Dec; 10 補巻1: 12~9]。

#### 【0021】

DNA上の5-メチルシトシンについて、比較的新しく、且つ、最も頻繁に応用されている確認方法は、重亜硫酸塩がシトシンに特異的に反応することに基づいている。シトシンは、アルカリ加水分解後にウラシルに転換されるが、ウラシルは、相補的塩基対をつくる際の骨格としてはチミジンと同様である。これに対して、5-メチルシトシンは、このような条件下では修飾されない。このため、元のDNAが置換されても、相補的塩基対をつくる骨格としては、本来シトシンと区別されず、メチルシトシンは「従来」の分子生物学的技術、例えば増幅とハイブリッド形成あるいは配列解析によって、本来の、単一のシトシンとして検出される。これらの技法は全て、相補的塩基対に基づいており、今日広く活用されている。この技術の感度面での基準は次の方法で評価される。実験対象のDNAをアガロース・マトリックスに包入し、こうして、DNAの拡散と再結合を防止する(重亜硫酸塩は一本鎖DNAとのみ反応する)。そして沈殿と洗浄処理を高速透析によって行う (Olek, A. *Nucl. Acids Res*. 1996, 24, 5064~5066)。この方法によって、ひとつ、ひとつの細胞を調べることができ、その潜在的能力を評価できる。事実、現在までのところ、約3,000塩基対ぐらいまでの個別領域しか調べられておらず、何千という細胞を全体的にメチル化分析することは不可能であった。ま

た、この手法は微量の試料中の小さい断片について信頼できる分析結果を出すことができなかった。これは、マトリックスによる拡散防止にもかかわらず、その喪失がおきるためである。5 - メチルシトシンを検出するという、一般的な課題の解決方法に関して、考察が次のレビューに掲載されている：Rein T., DePamphilis, M. L., Zorbas H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255.

#### 【0022】

重亜硫酸塩法は、今日までのところ、数少ない例外（例：Zechnick, M.ら、Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94~98）を除いて研究には使用されなかった。既知の遺伝子の特定部分を増幅し、更に、完全に配列を解析する（Olek, A.とWalter J., Nat. Genet. 1997, 17, 275~276）とか、個別のシトシンの位置をプライマー伸張反応（Gonzalgo, M. L.とJones, P. A. Nucleic Acids Res. 1997, 25, 2529~2531, WO - Patent 9500669）や、制限酵素切断法（Xiong Z. と Laird P. W., Nucleic Acids Res. 1997, 25, 2532~2534）で確認することは、ますます簡便になってきている。その上更に、ハイブリッド形成による確認も行われ、記述されている（Olek ら, WO - A99 / 28498）。

10

#### 【0023】

重亜硫酸塩法を個別の遺伝子でのメチル化の確認に応用した例は、Xiong ZとLaird P. W. (1997), Nucleic Acids Res. 25, 2532、Gonzalgo, M. L.とJones, P. A. (1997), Nucleic Acids Res. 25, 2529; Grigg, S.とClark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnik, M.ら(1977), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R.ら(1994), Nucleic Acids Res. 22, 695; Martin, V.ら(1995), Gene 157, 261; WO - A97 / 46705, WO - A95 / 15373及びWO - A95 / 45560などで発表されている。

20

#### 【0024】

オリゴマー配列の合成における現在の技術水準についての概観は、1999年1月に、Nature Geneticsの別冊（Nature Genetics Supplement, Volume 21, 1999年1月）、ならびにこの文献の中で引用されている文献に掲載されている。

30

#### 【0025】

固定されたDNA配列の解析のためには、種々の蛍光識別を施した試薬が用いられる。とりわけ、蛍光識別に適しているのは、各プローブの5' - OH基に色素のCy3あるいはCy5を単に結合させることである。ハイブリッド形成（相補結合）されたプローブの蛍光の検出は、例えば共焦点顕微鏡を用いて行われる。色素のCy3とCy5は、他の多くの色素と同様市販されている。

#### 【0026】

レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（MALDI - TOF）が開発され、生体分子の分析効率が非常に高い[Karas, M.とHillenkamp, F. (1988), 分子量が10,000ダルトンを超えているタンパク質のレーザー脱着イオン化, Anal. Chem. 60: 2299~2301]。分析対象が脱離を起こすマトリックスの中に混和される。短いレーザーパルスによってマトリックスは気化し、分析対象分子は気体相へと蒸散する。マトリックス分子の衝突によって分析対象物がイオン化する。加えられた電圧によってイオンは加速され、無電場の管へと送りこまれる。異なる質量に基づいて、イオンは異なった加速度を受ける。より小さなイオンは、より大きなイオンよりも早く検出部に到達する。

40

#### 【0027】

50

MALDI-TOF 分析装置は、ペプチドや蛋白質の分析に、非常に適している。核酸の分析はそれよりやや難しい [Gut I. G., と Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147~157]。核酸の場合は、感度はペプチドの場合の約 100 倍低く、断片が大きくなるに従って、更に、低下する。複雑な負電荷を持つ骨格を有する核酸にとっては、マトリックスを用いたイオン化法は極めて非効率的である。MALDI-TOF 分析装置ではマトリックスの選択が、非常に重要な役割を担っている。ペプチドからの放出に関しては、いくつかの効率のよいマトリックスが見つかったが、それらは非常に微細な結晶化によって合成される。DNA に関しても、興味深いマトリックスが存在するのは事実であるが、感度の向上には到っていない。DNA を化学的に修飾し、ペプチドに似た形にすることによって、感度を向上させることができる。ホスホチオエート核酸では、骨格の通常のリン酸はチオリン酸によって置換されているが、これは単純なアルキル化反応によって中性電荷の DNA に変換される [Gut, I. G. と Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367~1373]。修飾された DNA に「電荷タグ」をカップリングすることにより感度はペプチドの場合に匹敵する程度にまで向上する。加えて、電荷タグの利点は、修飾されていない基質の検出を極めて難しくする異物混入を防ぎ、その安定性を向上させる点である。

10

20

#### 【0028】

ゲノム DNA は、細胞、組織または他の検査試料の DNA から定法により採集できる。この定法は、Fritsch と Maniatis の Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) といった参考文献に記載されている。

#### 【0029】

本発明は上記のような従来技術の問題点に鑑み、与えられた DNA 試料中に存在する、多数のシトシン塩基の 5 位にメチル基が結合している状態を、ハイブリッド形成によって同時に検出することを可能とする、非常に高効率、且つ、信頼度の高い方法を提供することを課題とするものである。そのためには、オリゴヌクレオチッド及び PNA オリゴマーが準備され、これらについては、発症及び疾病の素因の診断方法を実施するために、遺伝学上及び/または新生のパラメーターの解析によるのが特に好ましい。

30

#### 【0030】

本発明において遺伝学上のパラメーターとは、請求項に於ける核酸の突然変異及び同質異象（配列 ID 1 から 40712 まで）及びそれらの制御のために、更に必要な配列である。特に、突然変異、挿入、欠失、点・突然変異、逆位、及び同質異象、とりわけ SNPs（単独ヌクレオチッド同質異象）が挙げられる。同質異象は挿入、欠失または逆位でもあり得る。

#### 【0031】

本発明において新生のパラメーターとは、特に、シトシンのメチル化及び、更に、請求項に於ける核酸の DNA 塩基の化学変化（配列 ID 1 から 40712 まで）及びそれらの制御のために更に必要な配列である。更に、新生のパラメーターは、例えば、前記方法で間接的に分析でき、再度の DNA のメチル化とは関連しない、ヒストンのアセチル化である。

40

#### 【0032】

本発明は、ゲノム DNA 試料中の配列コンテキスト 5' - CpG - 3' 内の少なくとも一つの特定シトシンのメチル化度を分析するのに役立ち、また、多数の異なるメチル化位置をも同時に分析する場合、特に有効である。

#### 【0033】

50

本発明の課題は、ゲノムDNA試料の配列コンテキスト5' - CpG - 3'における特定のシトシンのメチル化度の検出方法により解決される。

即ち、その方法は以下の通りである。a) ゲノムDNAを処理して、シトシン塩基をウラシルに変換する一方、5 - メチルシトシンは変換せず、b) ゲノムDNA中、前記特定シトシンを含む部分を増幅し、この際、増幅産物には検出可能な標識を与え、c) 2種類のオリゴヌクレオチド及び/またはPNAオリゴマーの少なくとも1種類の配列上で増幅産物のハイブリッド形成が起きるようにし、d) 増幅産物が2種類のオリゴヌクレオチド上にハイブリッド形成している量を、増幅産物の標識を検出することで同定し、e) ハイブリッド形成の結果、2種類のオリゴヌクレオチド上に検出される標識の割合から、ゲノムDNAにおける前記特定のシトシンのメチル化度を推定する。

10

#### 【0034】

特に、本発明のc)においては、増幅産物を2種類のオリゴマー（オリゴヌクレオチド及び/またはPNAオリゴマー）の少なくとも1種類に結合するようにハイブリッド形成させ、第1のオリゴマーは、前記特定シトシンがゲノムDNA中でメチル化されているならば、ゲノムDNAを化学的に処理して得られるDNA配列と優先的にハイブリッド形成するようにし、第2のオリゴマーは前記特定シトシンがゲノムDNA中でメチル化されていないならば、ゲノムDNAを化学的に処理して得られるDNA配列と優先的にハイブリッド形成する。2種類のオリゴマーのうちの1種は、例えば、一つのCGを中央に含有するオリゴヌクレオチッドで形成することができ、他の1種は一つのTG（または一つのCA、対向する鎖に）を中央に含有するオリゴヌクレオチッドで形成される。オリゴマー配列の残りの部分は上記2種類の間で一致する。この場合、メチル化での亜硫酸塩による変換のように、第1のオリゴヌクレオチッド配列に（調べる特定のシトシンについて）、ハイブリッド形成される。逆に、第2のオリゴヌクレオチッド配列では非メチル化での亜硫酸塩による変換のように、ハイブリッド形成される。

20

#### 【0035】

特に、本発明のc)においては、増幅産物を2種類のオリゴマー（オリゴヌクレオチド及び/またはPNAオリゴマー）の少なくとも1種類に結合するようにハイブリッド形成させ、第1のオリゴマーは、前記特定シトシンがゲノムDNA中でメチル化されているならば、ゲノムDNAを化学的に処理して得られるDNA配列と優先的にハイブリッド形成するようにし、配列には優先度を下げ、第2のオリゴマーは前記特定シトシンがゲノムDNA中でメチル化されていないならば、ゲノムDNAを化学的に処理して得られるDNA配列と優先的にハイブリッド形成され、第2のオリゴマーは増幅産物に本質的に、前記ゲノムDNA中の特定のシトシンのメチル化度に依存せずにハイブリッド形成される。

30

#### 【0036】

特に、本発明のc)においては、増幅産物を2種類のオリゴマー（オリゴヌクレオチド及び/またはPNAオリゴマー）の少なくとも1種類に結合するようにハイブリッド形成させ、第1のオリゴマーは、前記特定シトシンがゲノムDNA中でメチル化されていないならば、ゲノムDNAを化学的に処理して得られるDNA配列と優先的にハイブリッド形成するようにし、配列には優先度を下げ、第2のオリゴマーは前記特定シトシンがゲノムDNA中でメチル化されているならば、ゲノムDNAを化学的に処理して得られるDNA配列と優先的にハイブリッド形成され、第2のオリゴマーは増幅産物に本質的に、前記ゲノムDNA中の特定のシトシンのメチル化度に依存せずにハイブリッド形成される。

40

#### 【0037】

この場合、第2のオリゴマーは増幅産物に本質的に、シトシンのメチル化度の特異性に依存することなく、増幅産物の一つの位置にメチル化され得ないシトシンの位置に対応してハイブリッド形成される。従って、最終的に増幅産物の濃度のみがハイブリッド形成の強さを決める。調べるべき特定のシトシンのメチル化度によって、第1のオリゴヌクレオチッドへのハイブリッド形成が為される。

#### 【0038】

本発明はゲノムDNA試料に対してのみならず、同様にして前記特定のシトシンがメチル

50

化されているのではなく、むしろメチル化されていない標準DNAに対してこれを用い、メチル化されていないDNAを用いて測定した際に、2種類のオリゴヌクレオチド上に検出される標識の割合をメチル化度0の標準値として用い、同様にして、メチル化されているDNAを用いて測定することにより2種類のオリゴヌクレオチド上に検出される標識の割合をメチル化度1の標準値として用い、これらの標準値をゲノムDNA試料のメチル化度の同定に使用することが好ましい。

【0039】

使用される標準DNA試料及びゲノムDNAから形成される増幅産物は区別できる標識を施されている。使用される標準DNA試料は区別できる標識を再度施されている。

【0040】

本発明においては、異なるゲノムDNA試料からの、異なる標識を含んでいる増幅産物について、この場合、それが2種類のオリゴヌクレオチッドを含んでいても、2種類のオリゴヌクレオチッドで同時に異なる試料を測定できる。

【0041】

異なる検出方法から得られる値の伝達について測定精度の上昇を達成するために、同じゲノムDNA試料からの増幅産物に異なる標識を含有させる。これは例えば、異なるフルオレスセンス色素で標識することによって達成できる。この場合の測定は、個々のフルオレスセンス色素の放出波長用に多数の導管を備えたフルオレスセンススキャナにより行われる。

【0042】

本発明においては、標識化はフルオレスセンスによる標識化である。

【0043】

更に、前記標識として蛍光マーカールを用いることが非常に好ましい。これにより、前記標識を、化学発色、紫外線吸収あるいは蛍光分極によって同定する。

【0044】

本発明においては重亜硫酸塩（＝亜硫酸水素塩，酸性亜硫酸塩）の溶液を用いて化学処理を施すことが非常に好ましい。

【0045】

本発明においては増幅のためにオリゴヌクレオチッドを使用し、このオリゴヌクレオチッドは、配列ID1から配列ID40712までの、化学処理されたDNAの、少なくとも塩基長18の断片である。重亜硫酸塩で処理したDNAに相補的プライマーを使用し、相補的プライマーは、制御可能で、続いてメチル化について調べられ得る、領域（CpG島）を増幅することが確実にされる。

【0046】

本発明におけるハイブリッド形成において、オリゴヌクレオチッド及び／またはペプチッド核酸（Peptide Nucleic Acid＝PNA）オリゴマーが使用される。これらは、配列ID1から配列ID40712までの、化学処理されたDNAの中の少なくとも塩基長9の配列断片にハイブリッド形成するか、または、これらに対応して、塩基配列が、少なくとも一つのCpGジヌクレオチッドを含有し、CpGジヌクレオチッドがオリゴマー中の、約1/3の量存在する。これらオリゴヌクレオチッドは、本発明の方法に従って、特異的なCpGのメチル化度を調べるのに好適である。これらオリゴヌクレオチッドは、適切なシトシンの位置にメチル化されたゲノムDNA試料由来の、処理済みDNAの増幅産物に、結合させることが好ましい。

【0047】

標識として放射性核種を使用することが好ましい。

【0048】

更に、標識としてマスマスペクトル計で同定可能で、分離可能な、質量標識を使用することが好ましい。

【0049】

本発明においては、PCR産物全体またはその特徴ある断片をマスマスペクトル計で同定し

10

20

30

40

50

、その質量によって一義的に特定することが好ましい。

【0050】

本発明においては、オリゴマー（オリゴヌクレオチド及び／またはPNAオリゴマー）が特に配列5' - CG - 3'を含むことが好ましい。

【0051】

本発明においては、オリゴマー（オリゴヌクレオチド及び／またはPNAオリゴマー）が特に配列5' - TG - 3'及び／または配列5' - CA - 3'を含むことが好ましい。

【0052】

更に、本発明においては、第1のオリゴヌクレオチドが5' - CG - 3'配列を含み、第2のオリゴヌクレオチドが5' - TG - 3'配列、及び／または5' - CA - 3'配列を含むことも、更に強く推奨される。第1と第2の種類のオリゴヌクレオチドが共通の固体相上に固定されていることが好ましい。更に、また、オリゴヌクレオチドが直角あるいは六角形の網目状の平坦な固体相上に配列されており、固体相上での特定のオリゴヌクレオチドの位置が、それぞれの配列と関連づけられていることが好ましい。

10

【0053】

更に、本発明においては、第1及び第2の種類のオリゴヌクレオチドが、個別に、実証可能な標識のセットでコード化されるビーズ上に固定される。この標識はビーズの同定のために、即ち、適切なビーズに結合する配列に役立つ。ビーズに結合している増幅産物は、増幅産物に結合している他の標識により、同定される。ビーズによる上記測定を行うための器具は、例えば、ルミネックス社製がある。

20

【0054】

本発明の方法においてはb)段階を以下に述べるように2つの段階に分けて実施することが特に好ましい。

a)請求項1に従って前処理されたDNA試料に非特異的にハイブリッド形成し、更に、PCR段階で一つ以上の増幅産物を生ずる、異なる配列を有する、少なくとも、一対のプライマーを用いたPCR準備増幅、

b)請求項1に従って前処理されたDNA試料[(+) - 鎖あるいは(-) - 鎖]の一片と同じであるか、または逆に相補的であり、増幅されるDNAに特異的にハイブリッド形成する、異なる配列のプライマーを有する、準備増幅において生じた産物のPCR増幅。

30

【0055】

ハイブリッド形成過程で本発明との関連で、二つの、Watson - Crick (定律) Regelに完全に反する相補的DNA単独鎖が、塩基のない対の発生なしに理解される。この場合ウラシルはチミンとみなされる。

【0056】

多数のDNA断片の増幅を、一つの反応容器内で実行することが、更に、好ましい。

【0057】

増幅には耐熱性のDNA複製酵素（ポリメラーゼ）を使用することが、更に、好ましい。

増幅に使用するプライマー・オリゴヌクレオチドはT、A、C塩基のみか、あるいは、T、A、G塩基のみを含むことが特に好ましい。

【0058】

異なる配列コンテキスト中の少なくとも10のCpG位置が同時に分析できることも、好ましい。異なる配列コンテキスト中の少なくとも50のCpG位置が同時に分析できることが、特に好ましい。異なる配列コンテキスト中の少なくとも100のCpG位置が同時に分析できることが非常に好ましい。異なる配列コンテキスト中の少なくとも500のCpG位置が同時に分析できることが更に、好ましい。異なる配列コンテキスト中の少なくとも1,000のCpG位置が同時に分析できることが最も好ましい。

40

【0059】

細胞系列、血液、喀痰、糞便、尿、脳脊髄液、あるいは眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房、肝臓などからとったパラフィンに封入された組織、組織学的標本、あるいはこれらの可能な混合物からゲノムDNA試料を得る手法が、好ましい。

50

## 【 0 0 6 0 】

患者あるいは各個人の身体にとって悪影響を与える症状の診断あるいは予後診断のために、本発明の方法の使用が望まれる。これらの悪影響を与える症状は以下のカテゴリーの少なくとも一つに含まれる、即ち、薬品の好ましくない副作用；ガン；中枢神経系の機能障害、損傷、疾患；攻撃性症状あるいは運動障害；脳損傷からくる臨床的、心理学的、社会学的結果；心理的障害および人格障害；痴呆及び／または関連する症候群；心臓循環器系疾患、機能障害、損傷；消化管の機能障害、損傷、疾患；呼吸器系の機能障害、損傷、疾患；外傷、炎症、感染、免疫及び／または回復；発達過程の異常としての身体の機能障害；損傷、疾患、皮膚、筋肉、結合組織、骨の機能障害；傷、疾患；内分泌、代謝の機能障害、損傷、疾患；頭痛あるいは性的機能障害である。

10

## 【 0 0 6 1 】

複数種類の細胞あるいは組織の分離、あるいは細胞分化研究のための本発明の方法の使用が、更に、好ましい。

## 【 0 0 6 2 】

ここに提案する発明の対象は、重亜硫酸塩を含む試薬、増幅産物合成のためのプライマー・オリゴヌクレオチド及び／または主に固体相上に固定されたオリゴヌクレオチド及び本発明の方法を実行するための説明書である。プライマーオリゴヌクレオチッド及び固定されたオリゴヌクレオチッドは前記のように配列 I D 1 から配列 I D 4 0 7 1 2 である。

## 【 0 0 6 3 】

細胞系列、血液、喀痰、糞便、尿、脳脊髄液、あるいは眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房、肝臓などからとったパラフィンに封入された組織、組織学的標本、あるいはこれらの可能な混合物からゲノム D N A 試料を得ることが好ましい。

20

## 【 0 0 6 4 】

この方法により、第 1 の操作では D N A 試料が化学的に処理され、5 - メチルシトシン塩基を除いて、全てのシトシン塩基がウラシルに変換される。この化学的処理は、重亜硫酸塩（＝亜硫酸水素塩，酸性亜硫酸塩）の溶液によって行われることが好ましい。

## 【 0 0 6 5 】

この操作方法は、ゲノム D N A 試料だけでは実行できず、むしろ同様にして、前記の特定シトシン位置がメチル化されているか、されていないか既知であるような標準 D N A を主に必要とする。

30

## 【 0 0 6 6 】

本発明の方法の第 2 の操作では、前記特定シトシンを含むゲノム D N A の一部が増幅される。この操作は、以下の二段階の操作で実行するのが好ましい。

## 【 0 0 6 7 】

1 . はじめに、異なる配列を有する、少なくとも一対のプライマーを用いて、P C R 準備増幅を実行し、化学的に前処理された D N A にハイブリッド形成する。この前処理では、シトシン塩基がウラシルに変換され、5 - メチルシトシン塩基は変換されないように行う。

2 . 次に、前増幅で生産された産物の P C R 増幅として、異なる配列のプライマーを用いて増幅を行う。プライマーは化学的に前処理された D N A [ ( + ) - 鎖あるいは ( - ) - 鎖 ] の一片に同方向あるいは逆方向に相補的であって、増幅しようとする D N A に特異的にハイブリッド形成し、増幅産物は、検出可能な標識を含む。

40

## 【 0 0 6 8 】

本発明の方法の下記の第 3 の操作では、増幅産物が二種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも一方にハイブリッド形成する。第 1 のオリゴヌクレオチドは、5 ' - C G - 3 ' 配列を含み、第 2 のオリゴヌクレオチドは、5 ' - T G - 3 ' 配列及び／または 5 ' - C A - 3 ' 配列を含む。第 1 と第 2 の種類のオリゴヌクレオチドは、主として、共通の固体相上に固定される。オリゴヌクレオチドは直角あるいは六角形の網目上の平らな固体相に配列され、特定のオリゴヌクレオチドの固体相上の位置は、それぞれの配列と関連づけられている。

50



## 【0069】

第1のオリゴヌクレオチドは、前記の特定シトシンがゲノムDNAの中でメチル化されている場合ゲノムDNAの化学的処理の結果として生ずる配列に優先的にハイブリッド形成する。第2のオリゴヌクレオチドは、前記の特定シトシンがゲノムDNAの中でメチル化されていない場合、ゲノムDNAの化学的処理の結果として生じる配列に優先的にハイブリッド形成する。

## 【0070】

多数のDNA断片の増幅は、単一の反応容器内で実行することが好ましい。主に耐熱性のDNA複製酵素を用いてPCR反応による増幅を行うことが好ましい。

## 【0071】

増幅に使用されるプライマー・オリゴヌクレオチドはT、A、C塩基のみ、またはT、A、G塩基のみを含むことが好ましい。

## 【0072】

第4の操作は、増幅産物の2種類のオリゴヌクレオチドへのハイブリッド形成の程度は、増幅産物の標識を検出することで同定される。標識は、蛍光標識、放射性物質、あるいは質量分析装置で測定できる分離可能な質量標識を用いることが非常に好ましい。標識は主に化学発光、紫外線吸収あるいは蛍光分極によって検出される。PCR産物は、全部同時に、あるいは、特徴的な断片が、質量分析装置で検出できる。これにより、PCR産物はその質量によって明瞭に同定される。

## 【0073】

最終操作では、ハイブリッド形成の結果、2種類のオリゴヌクレオチド上に検出される標識の割合から、ゲノムDNA試料内の前記の特定シトシンのメチル化度が同定される。

## 【0074】

メチル化されていない標準DNAを用いて測定された、2種類のオリゴヌクレオチドに検出される標識の割合が、主としてメチル化度0の標準値として使用される。

## 【0075】

同様に、メチル化された標準DNAを用いて測定された、2種類のオリゴヌクレオチドに検出される標識の割合が、主としてメチル化度1の標準値として使用される。これらの標準値を、ゲノムDNA試料のメチル化度の同定に使用することが好ましい。

## 【0076】

標準値の同定には、多種類の既知の標準DNAも同様に使用可能であって、それら各々について、前記特定シトシンのメチル化度が知られている。

## 【0077】

本発明の方法は、異なる配列コンテキストにおける少なくとも10のCpG位置が同時に分析可能であることを特徴とする。更に、異なる配列コンテキストにおける少なくとも50のCpG位置が同時に分析可能であることが好ましい。その上、異なる配列コンテキストにおける少なくとも100のCpG位置が同時に分析可能であることが好ましい。異なる配列コンテキストにおいて、少なくとも500のCpG位置が同時に分析可能であることが好ましい。最終的には、異なる配列コンテキストにおいて、少なくとも1,000のCpG位置が同時に分析可能であることが非常に好ましい。

## 【0078】

ここに述べる手法は、患者あるいは各個人にとって有害な症状の診断あるいは予後診断に使用されることが望まれる。これらの有害な症状は以下のカテゴリーの少なくとも一つに含まれる、即ち、薬品の副作用；ガン；中枢神経性の機能障害、損傷、疾病；攻撃性症状あるいは運動障害；脳損傷からくる臨床的、心理学的、社会学的結果；心理的障害および人格障害；痴呆および/または関連する症候群；心臓循環器系疾患、機能障害、損傷；消化管の機能障害、損傷、疾患；呼吸器系の機能障害、損傷、疾患；外傷、炎症、感染、免疫および/または回復；発達過程の異常としての身体の機能障害、損傷、疾患；皮膚、筋肉、結合組織、骨の機能障害、損傷、疾患；内分泌、代謝の機能障害、損傷、疾患；頭痛あるいは性的機能障害である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 9 】

ここに述べる方法は、複数種類の細胞や組織の分別、細胞分化の研究に使用することが好ましい。

## 【 0 0 8 0 】

2種類の定義されたオリゴヌクレオチドの種類、例えばC G / T Gを含む配列のハイブリッド形成の割合は、未知の組織試料全体のハイブリッド形成の程度とは別に同定することができる。

## 【 0 0 8 1 】

未知の組織試料に対する補正のため、メチル化されていない比較標本と、メチル化されている比較標本を標準として使用する。

10

## 【 0 0 8 2 】

本発明によれば、重亜硫酸塩を含む試薬、増幅産物合成のためのプライマーオリゴヌクレオチド、及び/または固体相上に固定されたオリゴヌクレオチドで構成される、ある種のキットとして実現される。第1のオリゴ・ヌクレオチドは5' - C G - 3'配列を含む。第2のオリゴヌクレオチドは5' - T G - 3'及び/または5' - C A - 3'配列を含む。このキットには、本発明の方法の実行にあたっての説明書も含まれる。

## 【 0 0 8 3 】

本発明の対象として更に、核酸が好ましい。

## 【 0 0 8 4 】

本発明の対象として、化学的に前処理されたゲノムDNA（配列ID1から40712）における、シトシンのメチル化度の検出に使用される、少なくとも10のオリゴマーsonde（オリゴヌクレオチッド及び/またはPNAオリゴマー）がある。遺伝及び/または新生パラメーターのデータ分析が、これらゾンデ（Sonde）により疾病の診断や特定の疾病素質の診断に使用できる。

20

## 【 0 0 8 5 】

また、本発明の対象として、処理済みのDNAで配列ID1から40712のものであって、少なくとも18塩基長の配列断片がある。この18塩基対長の、配列ID1から40712の配列断片は処理済みのゲノムDNAの増幅に利用される。この断片の検出には少なくとも9ヌクレオチッド長のオリゴマーが使用される。

## 【 0 0 8 6 】

オリゴマーは少なくとも一つのCpGジヌクレオチッドを含む。対応するCpGジヌクレオチッドのシトシンは、オリゴマーの約1/3の量存在する。各CpGジヌクレオチッド毎に少なくとも配列ID1から40712のオリゴヌクレオチッドが存在する。

30

## 【 0 0 8 7 】

オリゴマーは、好ましくは、担体上に固定された配列で作製される。このとき、少なくとも一つのオリゴマーが固相に結合する。オリゴマーゾンデの固相への結合方法は専門家が承知している。

## 【 0 0 8 8 】

この関連の中で、重要なことは、請求項に記載されている核酸（配列ID1からID40712）の遺伝及び/または新生のパラメーターの診断のために、個々のCpGジヌクレオチッドではなく、配列中に存在する相当多数のCpGジヌクレオチッドが分析されねばならぬということである。本発明の、特に好ましい他の方法において、配列中に存在する全てのCpGジヌクレオチッドが調べられねばならぬ。

40

## 【 0 0 8 9 】

全てのオリゴマーゾンデは同じ鎖長を有する。好ましくは、全て18オリゴマーで、これは、中央に一つのC Gジヌクレオチッドを有し、配列ID1からID40712の塩基対にハイブリッド形成する。

## 【 0 0 9 0 】

本発明の他の方法では、少なくとも10個のオリゴマーがシトシンのメチル化度及び/または単独のヌクレオチッド - ポリモルフィズム（SNPs）によって化学処理されたゲノ

50

ムDNAの検知に使用される。

【0091】

オリゴマーは、以下の諸症状の診断に使用される。即ち、薬品の副作用；ガン；中枢神経性の機能障害、損傷、疾病；攻撃性症状あるいは運動障害；脳損傷からくる臨床的、心理学的、社会学的結果；心理的障害および人格障害；痴呆および／または関連する症候群；心臓循環器系疾患、機能障害、損傷；消化管の機能障害、損傷、疾；、呼吸器系の機能障害、損傷、疾患；外傷、炎症、感染、免疫および／または回復；発達過程の異常としての身体の機能障害、損傷、疾患；皮膚、筋肉、結合組織、骨の機能障損傷、疾患；内分泌、代謝の機能障害、損傷、疾患；頭痛あるいは性的機能障害等がメチル化サンプルの分析により診断される。

10

【0092】

発症の診断または特定の発症の疾病素因の診断に用いる遺伝及び／または新生のパラメータのデータの分析のために、少なくとも一つが、配列記録にリストアップされた核酸またはその重要な部分（配列ID1から配列ID40712）によって使用される。

【0093】

オリゴマーの配列においてウラシルをチミンと交換するのは同様の目的を満たすものであるが、このことは専門家には理解できる。

【0094】

分析されるゲノムDNAは十分なDNAの供給源を有する。即ち、細胞系列、血液、喀痰、糞便、尿、脳脊髄液、あるいは眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房、肝臓などからとったパラフィンに封入された組織、組織学的標本、あるいはこれらの可能な混合物からゲノムDNA試料を得ることが好ましい。

20

【0095】

本発明の対象は化学前処理された、配列ID1から配列ID40712のDNAで、少なくとも18塩基長の配列断片を有する核酸である。

【0096】

本発明の対象は化学処理されるDNA中のメチル化度の検出用のオリゴマー〔オリゴヌクレオチッドまたはPeptide Nucleic Acid (PNA)〕であり、少なくとも9ヌクレオチッドの長さの塩基配列を少なくとも有し、配列ID1から配列ID40712の化学処理されたDNAにハイブリッド形成される。そのとき、本発明においては、塩基配列が少なくとも一つのCpGジヌクレオチッドを含むことが好ましい。更に、好ましくは、CpGジヌクレオチッドのシトシンがオリゴマーの約1/3量存在する。

30

【0097】

本発明の対象は、本発明におけるオリゴマーの、配列ID1から配列ID40712の配列の少なくとも一つのCpGジヌクレオチッドに、少なくとも一つのオリゴマーが含有されるというデータである。更に、オリゴマーの配列ID1から配列ID40712の配列の一つのCpGジヌクレオチッド毎に一つのオリゴマーが含有されるというデータである。

【0098】

本発明の対象は、少なくとも二つの核酸のデータであって、二つの核酸は、本発明における、少なくとも配列ID1から配列ID40712の配列の一つまたはその断片の増幅のためのプライマーオリゴヌクレオチッドとして、投入される。その際、好ましくは、少なくとも一つのオリゴヌクレオチッドが固相に結合している。

40

【0099】

本発明の対象は、シトシンのメチル化度及び／または化学的前処理された、ゲノムDNAの、配列ID1から配列ID40712の配列の、単独ヌクレオチッド-ポリモルフィズム(SNPs)の検出用オリゴマーゾンデである。これは、少なくとも10の本発明における前記オリゴマーである。

【0100】

本発明の対象は、更に、配列ID1から配列ID40712の配列の、CpGジヌクレオ

50

チッドのメチル化度に関連する発症、分析用の各種オリゴマーの担体上の固定配列の方法であり、そこでは、少なくとも、本発明における一つのオリゴマーが固相に結合している。

【0101】

本発明の対象は、固相に結合する本発明における各種のオリゴマーの配列である (Array)。

【0102】

本発明の対象は、異なるオリゴヌクレオチッドの配列及び/またはPNAオリゴマー配列であり、このとき、これらは正方形または六角形の網目状の平坦な固相表面上に配列される。このとき、好ましくは、固相表面がシリカ、ガラス、ポリスチロール、アルミニウム、鋼、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなる。

10

【0103】

本発明は発病の原因となる、少なくとも前記核酸と同じ内容の遺伝子のメチル化度に関連する分析用のDNA及び/またはPNA配列に関する。

【0104】

【実施例】

本発明を以下の実施例により更に詳しく説明する。

【0105】

[実施例1]

メチル化されていないDNAと完全メチル化されたDNAの合成、および重亜硫酸塩の処理の説明

20

【0106】

完全メチル化されたDNAの合成のために、ヒトのゲノムDNAをS-アデノシル・メチオニンとCpGメチル化酵素 (SssI, New England Biolabs) を説明書に従って使用する。メチル化されていないDNAの合成のために、遺伝子ELK-1 (受入れ番号ep59011) をヒトのゲノムDNAに由来するプライマー、GCTCTATGGTCTTGTCTAACCGTA及びAGGTGGTGGTGGCGGTGGを用い、PCR増幅する。こうして合成され、メチル化されたDNA、メチル化されていないDNAは、ヒトのゲノムDNAと同様に、重亜硫酸塩 (= 亜硫酸水素塩, 酸性亜硫酸塩) による変換処理を受け、5位でメチル化されていないシトシンが全て変換され、相補的結合骨格としては、異なる塩基が生じる。その一方、5位がメチル化されたシトシンは変換されずに残る。反応には、0.1Mから6Mの濃度範囲の重亜硫酸塩が使用され、メチル化されていないシトシン塩基上に付加される。その上、変性のための薬品、溶媒およびラジカル供与体に加えらる。続いておきるアルカリ加水分解の結果、メチル化されていないシトシン核酸塩基からウラシルへの変化がおきる。変化しなかったDNAはメチル化されているシトシンの検出のために使用される。

30

【0107】

[実施例2]

Cy5で標識されたプローブの合成の説明

【0108】

重亜硫酸塩で処理されたDNAを基に、ELK-1遺伝子のプロモーター領域上で529塩基対の長さを持つ特定の断片が増幅される (受入れ番号ep59011)。増幅は、プライマー・オリゴヌクレオチドATGGT T T T G T T T A A T Y G T A G A G T T G T T T とT A A A C C C R A A A A A A A A A A C C C A A T A Tを用いて行う。蛍光色素Cy5で標識されたプライマー・オリゴヌクレオチドを使用することで、断片はPCRを行う際に標識される。マトリックスDNAとして、重亜硫酸塩 (= 亜硫酸水素塩, 酸性亜硫酸塩) で処理された (1) メチル化されていないDNA、(2) 完全メチル化されたDNA、(3) ヒトゲノムDNAが変換される。続いて、これら3種類の異なるDNAは、別々にハイブリッド形成され、特定のCpG位置のメチル化度が分析される。

40

【0109】

50

## 〔実施例 3〕

ハイブリッド形成とハイブリッド形成される DNA チップの開発の説明。

## 【0110】

実施例 2 で合成されたプローブは、DNA チップ上でハイブリッド形成される。チップには、まずオリゴ・ヌクレオチドが固定されている。このオリゴ・ヌクレオチド配列は実施例 2 で述べた ELK - 1 遺伝子の増幅された断片の一部であり、CG ジヌクレオチドとその近傍の配列に相当する。オリゴヌクレオチドの長さは 14 から 22 ヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチド内の CG ジヌクレオチドの位置は可変である。ハイブリッド形成後、DNA チップは走査され（図 1 を参照）、ハイブリッド形成信号が数値として読み取られる（データは示されていない）。オリゴヌクレオチド CTACTCAACGAAAAACA  
 AAA と CTACTCAACAAAAACA  
 AAA を図 1 と図 2 に示す。増幅産物の位置 103 にある ELK - 1 断片のシトシンがメチル化されている場合は CTACTCAACG  
 AAAAAACA  
 AAA がハイブリッド形成し、このシトシンがメチル化されていない場合は CTACTCAACAAAAACA  
 AAA がハイブリッド形成することが好ましい。

## 【0111】

図 1 は、ELK - 1 断片とハイブリッド形成を行った後の DNA チップを示す。スキャンを行ったあとと同じような、疑似色の像が描画される。ここに示した白黒のコピーと異なり、スキャナーではカラー像が生み出される。異なる色の光強度がハイブリッド形成の程度を示す。ハイブリッド形成の程度は赤（図 1 では明るい点に見える）から青（図 1 では暗い点に見える）へと減少する。

## 【0112】

図 2 A は、図 1 の一部を切り出したものである。ハイブリッド形成の概要を明確にするために、スポットとして検出された一対のオリゴヌクレオチドに白く縁取りをつけたのが ctactcaacaaaaaca  
 aa（左）と ctactcaacgaaaaaca  
 aa（右）である。

図 2 B の部分写真は、組織標本の未知のメチル化状態であり、部分写真図 2 C は完全メチル化された比較標本のメチル化状態を示す。

## 【0113】

【表 1】

検出用オリゴマー配列	試料 A (メチル化されていない)		試料 B (未知のメチル化状態)		試料 C (完全メチル化状態)	
	蛍光性 (回数)	平均値	蛍光性 (回数)	平均値	蛍光性 (回数)	平均値
ctactcaacgaaaaacaaa	3352		6102		6002	
ctactcaacgaaaaacaaa	2950		6775		7898	
ctactcaacgaaaaacaaa	4196		6360		7485	
ctactcaacgaaaaacaaa	5181		5521		11401	
		3920		6190		8197
ctactcaacaaaaacaaa	20577		7074		7290	
ctactcaacaaaaacaaa	19709		9171		9985	
ctactcaacaaaaacaaa	24130		7603		9286	
ctactcaacaaaaacaaa	21601		9434		12435	
		21504		8321		9749
CG/CA		0, 28		0, 74		0, 84

## 【0114】

平均値は、それぞれ波長 635 nm に対して求められている。表 1 に示すように、試料 A 欄はメチル化されていない試料の値、試料 B 欄は組織標本の未知のメチル化状態、試料 C 欄は完全メチル化された比較標本の値を示す。CG/CA の値はそれぞれの試料のメチル化度を表す。0, 74 という値は、この試料が本質的には完全にメチル化されていること

を意味する。

【0115】

[実施例4]

特定のCG位置のメチル化を調べる遺伝性の非ポリープ性結腸・直腸癌に関連するhMLH1遺伝子断片に関する。

【0116】

先ず第1段階で、遺伝配列が重亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩）等で処理され、塩基の5位置がメチル化されていない全てのシトシンが化学変化する。塩基対の状態が異なる塩基が生成する。一方、5位置がメチル化されているシトシンは変化しない。この反応には濃度範囲0.1～6モルの重亜硫酸塩が使用され、非メチル化シトシン塩基に付加される。そこに変性剤または溶剤及びラジカル捕捉剤が添加される。続いて、アルカリ加水分解により非メチル化シトシン塩基がウラシルに変化する。これら変化したDNAがメチル化シトシンの存在を証明するのに役立つ。

10

第2段階では、DNA試料は水または水溶液で希釈される。続いて、DNAの脱スルフォン（10～30分、90～100）がアルカリ性のpH値で行われる。

第3段階では、DNA試料をポリメラーゼ鎖反応、好ましくは、耐熱性DNAポリメラーゼで増幅する。この実施例ではhMLH1遺伝子のシトシンは、1551塩基対という大きな5'両側領域で、調べられる。これは特殊なプライマーオリゴヌクレオチッドAGCAACACCTCCATGCACCTG及びTTGATTGGACAGCTTGAAATGCで規定される、719塩基長の断片で増幅される。この増幅産物はこれまで固相に結合しているオリゴヌクレオチッドに、複製構造の形成下、ハイブリッド形成する試料として働く。例えば、GAAGAGCGGACAG、実証すべきシトシンは増幅産物の588位置に存在する。ハイブリッド形成産物の検出はCy3及びCy5フルオレスセンス標識された、増幅に使用された、プライマーオリゴヌクレオチッドによる。もし、重亜硫酸塩で処理されたDNAがメチル化シトシン位置を提示するならば、増幅されたDNAのハイブリッド形成へオリゴヌクレオチッドが作用する。調べるべきシトシンのメチル化度はハイブリッド形成産物で決定される。

20

【0117】

[実施例5]

アガロースビーズを使用した重亜硫酸塩処理DNAの作製

30

【0118】

この実施例で、重亜硫酸塩で処理されたDNAからの、ELK-1遺伝子（受付番号ep59011）のプロモーター領域の529塩基対の長さの、規定された断片が増幅される。フルオレスセンス色素ALEXA488で標識されているプライマーオリゴヌクレオチッドのATGGTTTGTTTAATYGTAGAGTTGTTT及びTAAACCCRAAAAAAAAAACCCCAATAT、の使用により断片は直接PCRで標識される。第1のオリゴヌクレオチッド（ここでは、例えば、ATTAAATAGCGTTTGTGGTT）及び第2のオリゴヌクレオチッド（ここでは、例えば、ATTAAATAGTGTTTTGGTT）は、ビーズの表面に固定され、これは個々の色素コードで区別される。次の段階で、前記プライマーオリゴヌクレオチッドで作製されたELK-1遺伝子の増幅産物、両者の混合物がビーズに添加され、その際、増幅産物が固定されたオリゴヌクレオチッドに対して、ここでは、例えば、ATTAAATAGCGTTTGTGGTT及びATTAAATAGTGTTTTGGTTが、その際、証明すべきCまたはTが増幅産物の476位置にあるが、ハイブリッド形成される。続いて、ビーズがばらばらにされ、色素コードによるフルオレスセンスの測定で同定され、フルオレスセンス色素ALEXA488に固有のフルオレスセンス強度の測定により、ハイブリッド形成の程度が確認される。

40

【0119】

[実施例6]

内部補償用の多種類の色素の使用

【0120】

50

20

〔 实施例 7 〕

【 0 1 2 2 】

30

40

[ 实施例 8 ]

【 0 1 2 4 】

50

ッド、ATGGTTTGTGTTTAATYGTAGAGTTGTTT及びTAAACCCRAAAAAAACCACAATAT、で増幅され、固定されるオリゴヌクレオチッド、ここでは、例えば、ATTAAATAGCGTTTGTGTTT及びATTAAATAGTGTGTTTGTGTTT、に対して、このとき、証明すべきC及びTが増幅産物の476の位置にあるが、ハイブリッド形成される。色素Cy3、Cy5、Cy2及びCy7でフルオレスセンス標識されたプライマーオリゴヌクレオチッドを使用することにより、異なるフルオレスセンス標識された試料の関係が比較でき、この方法により、高い実験信頼性が得られる。

【配列表】

【図面の簡単な説明】

10

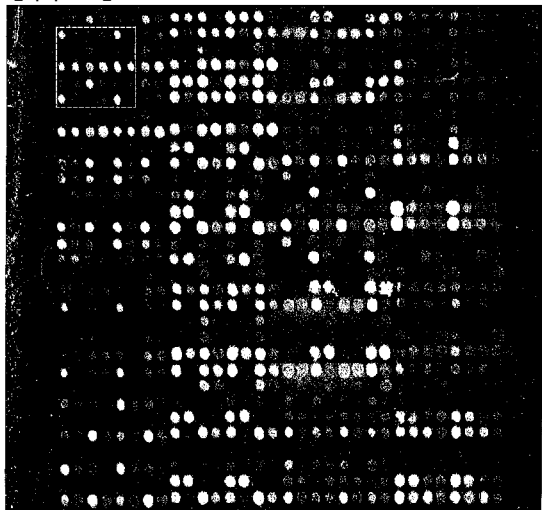
【図1】

図1は、ELK-1断片とハイブリッド形成した後のDNAチップを示す。

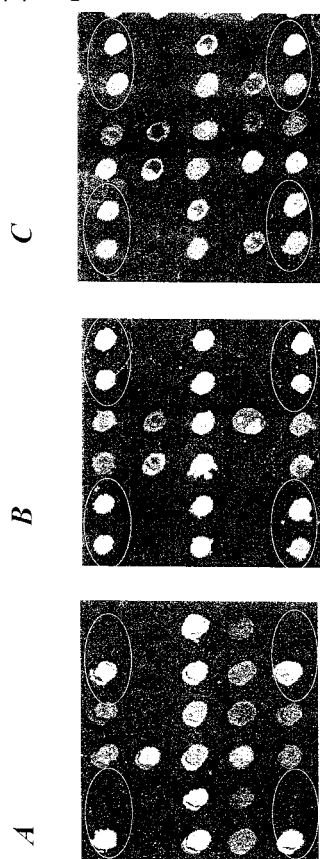
【図2】

図2Aは、図1の一部を切り出したものであり、図2Bは、組織標本の未知のメチル化状態を示す部分写真図であり、図2Cは、完全メチル化された比較標本のメチル化度を示す部分写真図である。

【図1】



【図2】





## 【国際公開パンフレット】

(M) 60211170501

(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  
7. März 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/18632 A2(51) Internationale Patenklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/0074

(22) Internationales Anmeldedatum:  
1. September 2001 (01.09.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 43 826.1 1. September 2000 (01.09.2000) DE  
100 44 543.8 5. September 2000 (05.09.2000) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,  
10435 Berlin (DE).(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OLEK, Alexan-  
der [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE);  
PIEPENBROCK, Christliss [DE/DE]; Schwartzkopfs-  
trasse 7 B, 10115 Berlin (DE); BERLIN, Kurt [DE/DE];  
MarienKörweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE); GÜTTG,  
David [DE/DE]; Kastanienallee 74, 10435 Berlin (DE).(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,  
10178 Berlin-Mitte (DE).(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AI, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DG, EC, EE, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LE, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CR, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts  
— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektro-  
nischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Inter-  
nationalen Büro erhältlichZur 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 DETERMINING THE DEGREE OF METHYLATION OF DEFINED CYTOSINES IN GENOMIC  
DNA IN THE SEQUENCE CONTEXT 5'-CPG-3'(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES METHYLIERUNGSGRADES VON BESTIMMTEN CYTOSI-  
NEN IN GENOMISCHER DNA IM SEQUENZKONTEXT 5'-CPG-3'(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting the degree of methylation of a defined cytosine in the sequence context  
5'-CPG-3' of a genomic DNA sample. The first stage involves chemically treating the genomic DNA in such a way that the cytosine  
bases, but not the 5-methylcytosine bases, are converted into uracil. Parts of the genomic DNA containing the defined cytosine are  
then amplified. The amplified parts are given a detectable mark and the extent of the hybridisation of the amplified parts on the two  
classes of oligonucleotides is then determined by detecting the mark of the amplified parts. The degree of methylation of the defined  
cytosine in the genomic DNA sample can be deduced on the basis of the relationship between the marks detected on the two classes  
of oligonucleotides following the hybridisation.(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades eines bestimmten Cytosins im Se-  
quenzkontext 5'-CPG-3' einer genomischen DNA-Probe. Im ersten Schritt wird die genomische DNA chemisch derart behandelt, dass  
die Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, nicht aber die 5-Methylcytosinbasen. Anschließend werden Teile der genomischen  
DNA amplifiziert, die das besagte bestimmte Cytosin enthalten, wobei die Amplifikate eine nachweisbare Markierung erhalten und  
in den folgenden Schritten wird das Ausmaß der Hybridisierung der Amplifikate an die zwei Klassen von Oligonukleotiden durch  
Detektion der Markierung der Amplifikate bestimmt und aus dem Verhältnis der an den zwei Klassen von Oligonukleotiden in  
Folge der Hybridisierung detektierten Markierungen auf den Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen  
DNA-Probe geschlossen.

WO 02/18632 A2

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

1

Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsgrades  
von bestimmten Cytosinen in genomischer DNA  
im Sequenzkontext 5'-CpG-3'

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades eines bestimmten Cytosins im Sequenzkontext 5'-CpG-3' einer genomischen DNA-Probe.

- 10 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
- 15 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
- 20 veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

- Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren, mit dem viele Cytosinbasen in einer gegebenen DNA-Probe
- 25 gleichzeitig auf das Vorliegen einer Methylgruppe an der Position 5 mittels Hybridisierung untersucht werden können. Sie beschreibt weiterhin Nukleinsäuren, Oligonukleotide, und PNA-Oligomere welche nützlich sind um das Verfahren zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen
- 30 oder der Prädisposition für Erkrankungen einzusetzen.

- 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der
- 35 Transkription, beim genetischen Imprinting und in der

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

2

- 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 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.
- 10 Die Methylierung von CpG Inseln wird oft mit Transkriptionsinaktivität gleichgesetzt. Obwohl es eindeutige Beweise dafür gibt, dass die CpG Inseln in den Promotoren der Gene zu finden sind, sind nicht alle CpG Inseln und Methylierungsstellen in bekannten Promotoren
- 15 lokalisiert. Bei verschiedenen gewebsspezifischen und „imprinting“ Genen sind die CpG Inseln in beträchtlichen Entfernungen stromabwärts des Transkriptionsstarts lokalisiert, zusätzlich besitzen viele Gene multiple Promotoren. Für eine Vielzahl von Erkrankungen wurde
- 20 Methylierung von CpG Dinukleotiden als ursächlich nachgewiesen. Im Gegensatz zu klassischen Mutationen, handelt es sich bei der DNA-Methylierung um einen Mechanismus, der eine Basensubstitution beschreibt, ohne die codierende Funktion eines Gens zu verändern. Dieses
- 25 Wechselspiel zwischen epigenetischer Modifikation und klassischen Mutationen spielt eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Beispielsweise sind fokale Hypermethylierung und generalisierte genomische Demethylierung Merkmale vieler verschiedener Tumortypen. Es wird angenommen, dass
- 30 die Tumorgenese und die Tumorprogression zum einen durch Hypermethylierung induzierter Mutationseignisse und zum anderen durch das Abschalten von Genen, welche die zelluläre Proliferation und/oder die induzierte Reaktivierung von Genen über Demethylierung
- 35 kontrollieren, die nur für die embryologische Entwicklung gebraucht werden, verursacht werden.

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

3

- Bei dem vererbbaaren non-polyposis Colorektalkrebs beruht z. B. der Hauptteil der mutationsnegativen Dickdarmkrebs Fälle eher auf der Hypermethylierung des hMLH1 Promotors und der anschließenden Nicht-Expression von hMLH1, ein Reparaturgen für Fehlpaarungen (Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer*. 2000 Jul 15;87(2):200-3.). Bei der Pathogenese von Lungenkrebs ist der Verlust der Expression mit der Methylierung von CpG Inseln in der Promotor Sequenz eines RAS Effektor-Homologs korreliert. (Damann R, Li C, Yoon JH, Chin FL, Bates S, Pfeifer GP, Nucleotide. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus3p21.3. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):315-9). Eine epigenetische Inaktivierung des LKB1 Tumorsuppressorgens, welche die Hypermethylierung des Promotors mit einschliesst, ist mit dem Peutz-Jeghers Syndrom assoziiert (Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, Lothe RA, Baylin SB, Aaltonen LA, Herman JG, Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene*. 2000 Jan 6;19(1):164-8).
- Eine Vielzahl von Erkrankungen, die mit Methylierung assoziiert sind, weisen in ihrer Ätiologie eine enge Verbindung zu den Tumorsuppressorgenen p16 oder p15 Gene auf. So wird eine Beziehung zwischen Mycoso fungoides und der Hypermethylierung des p16(INK4a) Gens angenommen (Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, Martinez P, Garcia C, Gomez E, Rodriguez JL, Garcia D, Vanaclocha F, Iglesias L, Piris MA, Algara P, p16(INK4a) gene alterations are frequent in lesions of mycosis fungoides. *Am J Pathol*. 2000 May; 156(5):1565-72). Auch wird von

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

4

- einer starken Korrelation zwischen dem Abschalten der Transkription des p16 Gens bei dem gastrischen Karzinom und der de novo Methylierung einiger weniger spezifischer CpG Stellen ausgegangen (Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ, Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16(INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2000 Jul 15;87(2):236-40). Die Pathogenese des Cholangiokarzinoms, welches mit der primär sklerosierenden Cholangitis assoziiert ist, wird mit der Inaktivierung des p16 Tumorsuppressorgens, welches wiederum von der Methylierung des p16 Promotors abhängig ist, in Zusammenhang gebracht (Ahrendt SA, Eisenberger CF, Yip L, Rashid A, Chow JT, Pitt HA, Sidransky D, Chromosome 9p21 loss and p16 inactivation in primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinoma. *J Surg Res*. 1999 Jun 1;84(1):88-93). Bei der Leukämogenese und beim Fortschreiten der akuten lymphatischen Leukämie spielt die Inaktivierung des p16 Gens durch Hypermethylierung eine Rolle (Nakamura M, Sugita K, Inukai T, Goi K, Iijima K, Tezuka T, Kojika S, Shiraishi K, Miyamoto N, Karakida N, Kagami K, O-Koyama T, Mori T, Nakazawa S, p16/MTS1/INK4A gene is frequently inactivated by hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 translocation. *Leukemia*. 1999 Jun;13(6):884-90). Weiterhin wird postuliert, dass die Hypermethylierung der p16 und p15 Gene eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese des multiplen Myeloms spielt (Ng MH, Wong IH, Lo KW, DNA methylation changes and multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 1999 Aug;34(5-6):463-72). An der Prädisposition des Nierenkarzinoms scheint das durch Methylierung

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

5

- inaktivierte VHL-Gen beteiligt zu sein (Glavac D, Ravnik-Glavac M, Ovcak Z, Masera A, Genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma (RCC). Pflugers Arch. 1996;431(6 Suppl 2):R193-4). Eine
- 5 abweichende Methylierung der 5' CpG Insel ist möglicherweise an der Transkriptionsinaktivierung des p16 Gens bei dem nasopharyngealen Karzinom beteiligt (Lo KW, Cheung ST, Leung SF, van Hasselt A, Tsang YS, Mak KF, Chung YF, Woo JK, Lee JC, Huang DF, Hypermethylation of
- 10 the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 1996 Jun 15;56(12):2721-5). Bei dem Leberzellenkarzinom wurde eine Inaktivierung des p16 Proteins nachgewiesen. Promotor Hypermethylierung und homozygote Deletionen gehören hier zu den häufigen Mechanismen (Jin M, Piao Z,
- 15 Kim NG, Park C, Shin EC, Park JH, Jung HJ, Kim CG, Kim H, p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma. Cancer. 2000 Jul 1;89(1):60-8). DNA-Methylierung als Kontrolle der Genexpression wurde für das BRCA1 Gen für Brustkrebs nachgewiesen (Magdinier F,
- 20 Billard LM, Wittmann G, Frappart L, Benchbaib M, Lenoir GM, Guerin JF, Dante R Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells FASEB J. 2000 Aug;14(11):1585-94). Eine Korrelation zwischen
- 25 Methylierung und Non-Hodgkin's Lymphom wird ebenfalls angenommen (Martinez-Delgado B, Richart A, Garcia MJ, Robledo M, Osorio A, Cebrian A, Rivas C, Benitez J, Hypermethylation of P16ink4a and P15ink4b genes as a marker of disease in the follow-up of non-Hodgkin's
- 30 lymphomas. Br J Haematol. 2000 Apr;109(1):97-103).

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

6

- CpG-Methylierung ruft auch das Fortschreiten der T-Zell Leukämie hervor, die in Zusammenhang mit der verminderten Expression des CDKN2A Gens steht (Nosaka K, Maeda M, Tamiya S, Sakai T, Mitsuya H, Matsuoka M, Increasing methylation of the CDKN2A gene is associated with the progression of adult T-cell leukemia. Cancer Res. 2000 Feb 15;60(4):1043-8). Bei Blasenkrebs wurde eine erhöhte Methylierung der CpG-Inseln festgestellt (Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, Nichols PW, Jones PA, Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. Cancer Res. 2000 May 1;60(9):2473-6). Die Transkriptionsinaktivierung von Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre wird in Verbindung mit der Methylierung des FHIT Gens gebracht, das mit dem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert ist (Shimada Y, Sato F, Watanabe G, Yamasaki S, Kato M, Maeda M, Imamura M, Loss of fragile histidine triad gene expression is associated with progression of esophageal squamous cell carcinoma, but not with the patient's prognosis and smoking history. Cancer. 2000 Jul 1;89(1):5-11). Die Neutral Endopeptidase 24.11 (NEP) inaktiviert das Wachstum von Neuropeptiden, die an dem Wachstum des Androgen unabhängigen Prostatakrebs beteiligt sind. Ein Verlust der NEP Expression durch Hypermethylierung des NEP-Promotors trägt möglicherweise zu der Entwicklung des Neuropeptid stimulierten Androgen unabhängigen Prostatakrebses bei (Usmani BA, Shen R, Janeczko M, Papandreou CN, Lee WH, Nelson WG, Nelson JB, Nanus DM, Methylation of the neutral endopeptidase gene promoter in human prostate cancers. Clin Cancer Res. 2000 May;6(5):1664-70). Der adrenokortikale Tumor bei Erwachsenen weist strukturelle Abnormalitäten bei Tumor-

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

7

- DNA auf. Diese Abnormalitäten beinhalten unter anderem eine Überexpression des IGF2 Gens in Korrelation mit einer Demethylierung der DNA an diesem Locus (Wilkin F, Gagne N, Paquette J, Oligny LL, Deal C, Pediatric
- 5 adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 May;85(5):2048-56. Review). Es wird angenommen, dass bei dem Retinoblastomen DNA-Methylierungen in mehreren Exons an der Erkrankung
- 10 beteiligt sind (Mancini D, Singh S, Ainsworth F, Rodenhiser D, Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spots in the retinoblastoma gene (RB1). *Am J Hum Genet.* 1997 Jul;61(1):80-7). Bei chronischer myeloischer Leukämie wird ein Zusammenhang zwischen der
- 15 Deregulation des p53 Gens und einer Veränderung des Methylierungsmusters mit der Progression der Erkrankung vermutet (Guinn BA, Mills KI, p53 mutations, methylation and genomic instability in the progression of chronic myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma.* 1997 Jul;26(3-4):211-
- 20 26). Auch für die akute myeloische Leukämie wurde ein Zusammenhang mit Methylierung nachgewiesen (Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 1999 Aug 1;59(15):3730-40). Es wurde eine
- 25 tumorspezifische Methylierungsstelle in dem Supressorgen für den Wilms Tumor identifiziert (Kleymenova EV, Yuan X, LaBate ME, Walker CL, Identification of a tumor-specific methylation site in the Wilms tumor suppressor gene. *Oncogene.* 1998 Feb 12;16(6):713-20). Bei dem Burkitt
- 30 Lymphom weisen einige Promotoren eine vollständige CpG-Methylierung auf (Tao Q, Robertson KD, Manns A, Hildesheim A, Ambinder RF, Epstein-Barr virus (EBV) in



WO 02/18632

PCT/EP01/10074

8

- endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood*. 1998 Feb 15;91(4):1373-81). Es wird angenommen, dass bei dem Schilddrüsenkarzinom die DNA-Methylierung eine Rolle spielt (Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB, Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na+/I-symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Jul;84(7):2449-57).
- 10 Nicht nur viele Krebserkrankungen sind mit Methylierung assoziiert, auch viele nicht Krebserkrankungen werden mit Methylierung in Zusammenhang gebracht. So weisen Untersuchungen zur entzündlichen Arthritis darauf hin, dass diese Erkrankung mit einer Untermethylierung
- 15 genomischer DNA assoziiert ist (Kim YI, Logan JW, Mason JB, Roubenoff R, DNA hypomethylation in inflammatory arthritis: reversal with methotrexate. *J Lab Clin Med*. 1996 Aug;128(2):165-72). Für das ICF-Syndrom wurde eine Methylierungs regulierte Expression nachgewiesen (Kondo
- 20 T, Bobek MP, Kuick R, Lamb B, Zhu X, Narayan A, Bourc'his D, Viegas-Pequignot E, Ehrlich M, Hanash SM, Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2). Die Beteiligung von Methylierung an systemischem Lupus erythematosus wird
- 25 vermutet (Vallin H, Perers A, Alm GV, Ronnblom L, Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 1999 Dec;163(11):6306-13); ebenso ein Zusammenhang zwischen
- 30 der Muskeldystrophie Duchenne und einer CpG reichen Insel (Banerjee S, Singh PB, Rasberry C, Cattaneach EM, Embryonic inheritance of the chromatin organisation of

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

9

- the imprinted H19 domain in mouse spermatozoa. Mech Dev. 2000 Feb;90(2):217-26; Burmeister M, Lehrach H, Long-range restriction map around the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature. 1986 Dec 11-17;324(6097):582-5).
- 5 Ein epigenetischer Effekt, der an der Untermethylierung des Amyloid Precursor Proteins, beteiligt ist, welches mit der Ausbildung der Erkrankung in Zusammenhang steht, wird bei der Alzheimer Erkrankung vermutet (West RL, Lee JM, Maroun LE, Hypomethylation of the amyloid precursor
- 10 protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. J Mol Neurosci. 1995;6(2):141-6). Auch auf chromosomaler Ebene spielt der Methylierungsstatus eine wichtige Rolle. Beispielsweise wird bei mentalen Retardierungssyndromen, die mit der Fragilität des X-Chromosoms gekoppelt sind, der Grad der
- 15 Chromosomenbrüchigkeit durch die Methylierung bestimmt (de Muniain AL, Cobo AM, Poza JJ, Saenz A, [Diseases due to instability of DNA]. Neurologia. 1995 Dec;10 Suppl 1:12-9).
- 20 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
- 25 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
- 30 durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

10

- 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
- 5 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 Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek,
- 10 A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). 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
- 15 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.
- 20 Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998,
- 25 26, 2255.
- Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnick, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden
- 30 kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalvo, M. L. und Jones,
- 35 P. A., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P.

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

11

W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO-A 99/28498).

- 5 Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalgo, M. L. und Jones, P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. und
- 10 Clark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnek, M. et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261; WO-A 97/46705, WO-A 95/15373 und WO-A 95/45560.
- 15 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) und der
- 20 dort zitierten Literatur entnehmen.
- Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das
- 25 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.
- 30 Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988), Laser
- 35 desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

12

Analyst 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 Spektrometrie 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 Spektrometrie 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

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

13

- 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
- 5 Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.
- 10 Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.
- 15 Die vorliegende Erfindung soll ein besonders effizientes und zuverlässiges Verfahren bereitstellen, das es erlaubt, viele Cytosinbasen in einer gegebenen DNA-Probe gleichzeitig auf das Vorliegen einer Methylgruppe an der
- 20 Position 5 mittels Hybridisierung zu untersuchen. Dazu werden zudem Oligonukleotide und PNA-Oligomere bereitgestellt, welche für die Verwendung des Verfahrens zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen und der Prädisposition für Erkrankungen durch Analyse eines
- 25 Satzes genetischer und/oder epigenetischer Parameter besonders geeignet sind.
- Genetische Parameter im Sinne dieser Erfindung sind Mutationen und Polymorphismen der beanspruchten
- 30 Nukleinsäuren (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) und zu ihrer Regulation weiterhin erforderliche Sequenzen. Insbesondere sind als Mutationen Insertionen, Deletionen, Punktmutationen, Inversionen und Polymorphismen und besonders bevorzugt SNPs (Single
- 35 Nucleotide Polymorphisms) zu bezeichnen. Polymorphismen

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

14

können aber ebenso Insertionen, Deletionen oder Inversionen sein.

- Epigenetische Parameter im Sinne dieser Erfindung sind insbesondere Cytosin-Methylierungen und weitere chemische Modifikationen von DNA-Basen der beanspruchten Nukleinsäuren (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) und zu ihrer Regulation weiterhin erforderliche Sequenzen. Weitere epigenetische Parameter sind beispielsweise die Acetylierung von Histonen, die jedoch mit dem beschriebenen Verfahren nicht direkt analysiert werden kann, sondern wiederum mit der DNA-Methylierung korreliert.
- Das vorliegende Verfahren dient zur Detektion des Methylierungsgrades mindestens eines bestimmten Cytosins im Sequenzkontext 5'-CpG-3' einer genomischen DNA-Probe. Besonders bevorzugt wird das Verfahren zur gleichzeitigen Detektion vieler verschiedener Methylierungspositionen verwendet.

- Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades eines bestimmten Cytosins im Sequenzkontext 5'-CpG-3' einer genomischen DNA-Probe gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass
- man die genomische DNA behandelt, wobei man die Cytosinbasen in Uracil umwandelt, nicht aber die 5-Methylcytosinbasen;
  - man Teile der genomischen DNA amplifiziert, die das besagte bestimmte Cytosin enthalten, wobei die Amplifikate eine nachweisbare Markierung erhalten;
  - man die Amplifikate an zwei Klassen von

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

15

Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren mit jeweils mindestens einem Mitglied hybridisiert;

- d) man das Ausmaß der Hybridisierung der Amplifikate an die zwei Klassen von Oligonukleotiden durch Detektion der Markierung der Amplifikate bestimmt;
- e) man aus dem Verhältnis der an den zwei Klassen von Oligonukleotiden in Folge der Hybridisierung detektierten Markierungen auf den Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA-Probe schliesst.

- Besonders bevorzugt ist dabei ein Verfahren, bei dem man in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied durchführt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge. Eine dieser zwei Klassen von Oligomeren koennen beispielsweise durch Oligonukleotide, die ein CG in der Mitte enthalten gebildet werden und die andere Klasse durch Oligonukleotide, welche in der Mitte ein TG (oder ein CA, im Gegenstrang) aufweisen. Die restlichen Teile der Oligomersequenzen sollten zwischen beiden Klassen bevorzugt übereinstimmen. In diesem Fall würden Oligonukleotide der ersten Klasse an die Sequenz (um das zu untersuchende bestimmte Cytosin) hybridisieren, wie sie nach Bisulfit Umsetzung in methylierten Fall vorläge, umgekehrt würden die der zweiten Klasse an die Sequenz hybridisieren, wie sie nach Bisulfit Umsetzung in unmethylierten Fall vorläge.



WO 02/18632

PCT/EP01/10074

16

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied durchführt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von dem Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.

Entsprechend ist auch ein Verfahren bevorzugt, bei dem man in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von dem Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.

35

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

17

In diesen Fällen hybridisiert also die zweite Klasse von Oligomeren an das Amplifikat, ohne dass sich eine wesentliche Methylierungsspezifität ergibt, demnach also bevorzugt an eine Position des Amplifikates die keinen methylierbaren Cytosin Positionen entspricht. Damit wird letztlich nur die Konzentration des Amplifikates über die Intensität der Hybridisierung bestimmt. Relativ dazu erfolgt die Hybridisierung an die erste Klasse von Oligonukleotiden in Abhängigkeit von dem Methylierungsgrad der zu untersuchenden bestimmten Cytosins.

Bevorzugt ist es, dass man das Verfahren nicht nur mit der genomischen DNA-Probe durchführt, sondern sinngemäß auch mit bekanntermaßen an der Position des besagten bestimmten Cytosins methyliert oder aber unmethyliert vorliegender Standard-DNA, wobei die jeweils mit der unmethylierten Standard DNA gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen als Eichwert für einen Methylierungsgrad von 0 und entsprechend die jeweils mit der methylierten Standard DNA gemäss gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen als Eichwert für einen Methylierungsgrad von 1 dienen und man diese Eichwerte für die Bestimmung des Methylierungsgrades der genomischen Proben-DNA einsetzt.

Besonders bevorzugt ist es, dass man weitere bekannte Standard DNA-Proben zur Eichung verwendet, die jeweils einen beliebigen bekannten Methylierungsgrad des besagten bestimmten Cytosins aufweisen.

Die verwendeten Standard DNA-Proben und die Probe (das aus einer genomischen DNA hergestellte Amplifikat) sind bevorzugt jeweils unterschiedlich markiert. Die

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

18

verwendeten Standard DNA Proben sind jeweils wiederum bevorzugt unterschiedlich markiert.

- Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man
- 5 Amplifikate, hervorgegangen aus verschiedenen genomischen DNA-Proben, mit unterschiedlichen Markierungen versieht. In diesem Fall ist es möglich, mit einem Satz von Oligonukleotiden der beiden Klassen gleichzeitig verschiedene Proben zu messen, sei es beispielsweise auf
- 10 einem Oligomer Array, welcher Oligonukleotide der beiden Klassen enthält.

- Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man Amplifikate, hervorgegangen aus derselben genomischen
- 15 DNA-Proben, mit unterschiedlichen Markierungen versieht, um über eine Mittelung der aus verschiedenen Detektionsverfahren erhaltenen Werte eine Erhöhung der Messgenauigkeit zu erreichen. Dies kann beispielsweise durch Markierungen mit unterschiedlichen
- 20 Fluoreszenzfarbstoffen erfolgen. Die Messung erfolgt in diesem Fall mittels eines Fluoreszenzscanners, welcher über mehrere Kanäle zur Messung der individuellen Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe verfügt.

- 25 Besonders bevorzugt ist demnach auch ein Verfahren, bei dem die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.

- Bevorzugt ist es erfindungsgemäß ferner, dass besagte Markierung eine Fluoreszenzmarkierung ist. Dabei ist
- 30 bevorzugt, dass man besagte Markierung durch Chemilumineszenz, ihre UV-Absorption oder Fluoreszenzpolarisation nachweist.

- Ganz besonders ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man
- 35 die Behandlung der DNA in Schritt a) mit einer Lösung eines Bisulfits (=Hydrogensulfit, Disulfit) durchführt.

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

19

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man für die Amplifikation Oligonukleotide verwendet, die einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 umfassen. Damit wird sichergestellt, dass man zu bisulfit behandelter DNA komplementäre Primer verwendet, welche in der Lage sind, regulatorische Regionen (CpG Inseln) zu amplifizieren, welche dann nachfolgend hinsichtlich Methylierung untersucht werden können.

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren bei dem man in einem Hybridisierungsschritt Oligonukleotide und/oder Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligomere verwendet, die an einen mindestens 9 Basen langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 hybridisieren oder diesem entsprechen, wobei die Basensequenz mindestens ein CpG Dinukleotid umfaßt und sich das CpG Dinukleotid in etwa im mittleren Drittel des Oligomers befindet. Diese Oligonukleotide sind geeignet, spezifische CpG Positionen hinsichtlich ihres Methylierungsgrades gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren zu untersuchen. Sie binden bevorzugt an die Amplifikate behandelter DNA, welche aus einer an der betreffenden Cytosin Positionen methylierten genomischen DNA Probe hervorgingen.

Bevorzugt ist auch, dass die Markierungen Radionuklide sind.

Bevorzugt ist ferner, dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

35

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

20

- Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, dass man die PCR-Produkte insgesamt oder deren charakteristische Fragmente im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 5 Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, dass die Oligomere (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) einer Klasse die Sequenz 5'-CG-3' umfassen.
- 10 Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, dass die Oligomere (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) einer Klasse die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3' umfassen.
- 15 Besonders bevorzugt ist es ferner auch, dass die Oligonukleotide der ersten Klasse die Sequenz 5'-CG-3' umfassen und die Oligonukleotide der zweiten Klassen die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3' umfassen.
- 20 Bevorzugt ist es auch, dass die Oligonukleotide der ersten und der zweiten Klasse auf einer gemeinsamen Festphase immobilisiert sind. Auch ist dabei bevorzugt, dass die Oligonukleotide auf einer ebenen Festphase in einem rechtwinkligen oder hexagonalen Raster angeordnet
- 25 sind und der Ort bestimmter Oligonukleotide auf der Festphase mit deren jeweiliger Sequenz korreliert ist.
- Ebenfalls besonders bevorzugt ist es, dass die Oligomere der ersten und zweiten Klasse auf Beads immobilisiert
- 30 sind, welche mit einem Satz getrennt nachweisbarer Markierungen codiert sind. Letztere dienen zur Identifizierung des Beads, d.h. der an das betreffende Bead gebundenen Sequenzen. Die an die Beads gebundenen Amplifikate werden dann mittels anderer Markierungen,
- 35 welche an die Amplifikate gebunden sind, identifiziert. Instrumente zur Durchführung solcher Messungen basierend

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

21

auf Beads werden beispielsweise von der Firma Luminex angeboten.

- Ganz besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes
- 5 Verfahren, wobei man den Schritt b) in zwei Teilschritten wie folgt durchführt:
- a) eine PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, die an eine nach Anspruch 1 vorbehandelte DNA-Probe unspezifisch
- 10 hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein Amplifikat ergeben;
- b) eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Sequenz, die jeweils zu einem Abschnitt der nach Anspruch
- 15 1 vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-)-Strang] identisch oder revers komplementär sind und an die zu amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

- Unter Hybridisierung wird im Zusammenhang dieser
- 20 Erfindung eine Hybridisierung zweier gemäß den Watson-Crick Regeln vollständig zueinander revers komplementärer DNA-Einzelstränge verstanden, ohne dass eine Basenfehlpaarung auftritt. Uracil wird in diesem Zusammenhang wie Thymin betrachtet.

- 25 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es ferner, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt wird.

- 30 Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass für die Amplifikation eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet wird. Besonders bevorzugt ist auch, dass die für die Amplifikation verwendeten Primeroligonukleotide der entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen
- 35 T, A und G enthalten.

WO 02/18632

PCT/EP01/19074

22

- Bevorzugt ist es auch, dass mindestens 10 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden. Besonders bevorzugt ist es, dass mindestens 50 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden. Ganz besonders bevorzugt ist es, dass mindestens 100 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden. Höchst bevorzugt ist es, dass mindestens 500 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden. Am bevorzugsten ist es, dass mindestens 1000 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden.
- 15 Erfindungsgemäß bevorzugt ist das Verfahren, wobei die genomische DNA-Probe aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder
- 20 Leber, histologischen Objektträgern oder allen möglichen Kombinationen hiervon erhalten wurde.
- Bevorzugt ist die Verwendung eines 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;
- 30 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
- 35 gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung,

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

23

Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz;  
Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als  
Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion,  
Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des  
5 Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische  
Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen  
oder sexuelle Fehlfunktion.

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

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit,  
umfassend ein Bisulfit enthaltendes Reagenz,  
15 Primeroligonukleotiden zur Herstellung der Amplifikate  
und/oder vorzugsweise an einer Festphase immobilisierte  
Oligonukleotiden sowie eine Anleitung zur Durchführung  
des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die  
Primeroligonukleotide und die immobilisierten  
20 Oligonukleotide werden wie oben beschrieben aus den Seq.  
IDs 1 bis 40712 abgeleitet.

Diese genomische DNA-Probe wird bevorzugt aus Zelllinien,  
Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-  
25 Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetem Gewebe,  
beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz,  
Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen  
Objektträgern oder allen möglichen Kombinationen hiervon  
erhalten.

30 Bei diesem Verfahren wird im ersten Schritt eine  
genomische DNA-Probe derart behandelt, dass außer den 5-  
Methylcytosinbasen alle Cytosinbasen in Uracil  
umgewandelt werden. Diese chemische Behandlung wird  
35 bevorzugt mit der Lösung eines Bisulfits  
(=Hydrogensulfit, Disulfit) durchgeführt.



WO 02/18632

PCT/EP01/10074

24

Dieser Verfahrensschritt kann nicht nur mit der genomischen DNA-Probe durchgeführt werden, sondern vorzugsweise sinngemäß auch mit bekanntermaßen an der  
5 Position des besagten bestimmten Cytosins methyliert oder aber unmethyliert vorliegender Standard-DNA.

Im zweiten Schritt des Verfahrens werden die Teile der genomischen DNA amplifiziert, die das besagte bestimmte  
10 Cytosin enthalten. Dieser Schritt kann besonders bevorzugt in zwei Teilschritten durchgeführt werden:

1. Zuerst wird eine PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz durchgeführt, die an eine chemisch vorbehandelte DNA hybridisieren.  
15 Diese Vorbehandlung erfolgte chemisch derart, dass die Cytosinbasen in Uracil umgewandelt wurden, nicht aber die 5-Methylcytosinbasen.

20 2. Eine PCR-Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts wird mit Primern unterschiedlicher Sequenz durchgeführt. Diese Primer sind identisch oder revers komplementär zu einem Abschnitt des chemisch vorbehandelten DNA [(+)-Strangs oder (-)-Strangs] und  
25 hybridisieren spezifisch an die zu amplifizierende DNA. Die Amplifikate enthalten vorzugsweise eine nachweisbare Markierung.

Im folgenden dritten Schritt des Verfahrens erfolgt eine  
30 Hybridisierung der Amplifikate an bevorzugt zwei Klassen von Oligonukleotiden mit jeweils mindestens einem Mitglied. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens umfassen die Oligonukleotide der ersten Klasse die Sequenz 5'-CG-3' und die Oligonukleotide der zweiten  
35 Klasse die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3'. Die Oligonukleotide der ersten und der zweiten Klasse

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

25

sind vorzugsweise auf einer gemeinsamen Festphase immobilisiert. Die Oligonukleotide sind auf einer ebenen Festphase in einem rechtwinkligen oder hexagonalen Raster angeordnet und der Ort der bestimmten Oligonukleotide ist auf der Festphase mit der jeweiligen Sequenz korreliert.

Die Oligonukleotide der ersten Klasse hybridisieren bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge. Die Oligonukleotide der zweiten Klasse hybridisieren bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge.

Die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten wird besonders bevorzugt in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Bevorzugt führt man die Amplifikation mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) durch, wobei vorzugsweise eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet wird.

Die für die Amplifikation verwendeten Primeroligonukleotide enthalten bevorzugt entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G.

Im vierten Verfahrensschritt wird das Ausmaß der Hybridisierung der Amplifikate an die zwei Klassen von Oligonukleotiden durch die Detektion der Markierungen der Amplifikate bestimmt. Die Markierungen sind besonders bevorzugt Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide oder ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden. Die Markierung werden vorzugsweise ebenfalls durch Chemilumineszenz, UV-Absorption oder Fluoreszenzpolarisation nachgewiesen. Die PCR-Produkte können auch bevorzugt insgesamt oder als

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

26

deren charakteristische Fragmente im Massenspektrometer nachgewiesen werden. Somit sind die PCR-Produkte durch ihre Masse eindeutig charakterisiert.

- 5 Im letzten Verfahrensschritt wird aus dem Verhältnis der an den zwei Klassen von Oligonukleotiden in Folge der Hybridisierung detektierten Markierungen auf den Methylierungsgrad des besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA-Probe geschlossen.
- 10 Die jeweils mit der unmethylierten Standard-DNA gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen dienen vorzugsweise als Eichwert für einen Methylierungsgrad von
- 15 0.
- Entsprechend dienen die jeweils mit der methylierten Standard-DNA gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen
- 20 vorzugsweise als Eichwert für einen Methylierungsgrad von 1. Diese Eichwerte werden besonders bevorzugt für die Bestimmung des Methylierungsgrades der genomischen DNA-Proben eingesetzt.
- 25 Für die Eichung können vorzugsweise auch weitere bekannte Standard DNA-Proben zur Eichung verwendet werden, die jeweils einen beliebigen bekannten Methylierungsgrad des besagten bestimmten Cytosins aufweisen.
- 30 Das Verfahren ist dadurch charakterisiert, dass bevorzugt mindestens 10 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden. Ferner können vorzugsweise mindestens 50 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert
- 35 werden. Bevorzugt ist außerdem, dass mindestens 100 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

27

gleichzeitig analysiert werden. Sehr bevorzugt ist die gleichzeitige Analyse von mindestens 500 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext. Besonders bevorzugt ist abschließend die gleichzeitige Analyse von mindestens 5 1000 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext.

Das beschriebene Verfahren wird bevorzugt verwendet zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen 10 Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von 15 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 20 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 25 Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Das vorliegende Verfahren wird besonders bevorzugt 30 verwendet zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Durch Bestimmung der Hybrisierungsverhältnisse zwischen den zwei eingesetzten Klassen von Oligonukleotiden (z.B. 35 enthaltend CG/TG) wird Unabhängigkeit von der Intensität

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

28

der Gesamthybridisierung der unbekannten Gewebeproben erreicht.

- 5 Zur Kalibrierung von unbekannten Gewebeproben werden unmethylierte und aufmethylierte Vergleichsproben als Standards eingesetzt.

- Bestandteil dieses Verfahrens ist ferner ein Kit, das ein Bisulfit enthaltendes Reagenz, Primeroligonukleotide zur  
10 Herstellung der Amplifikate und/oder vorzugsweise an eine Festphase immobilisierte Oligonukleotide umfasst. Die Oligonukleotide (erste Klasse) umfassen die Sequenz 5'-CG-3'. Die Oligonukleotide (zweite Klasse) umfassen die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3'. Zu dem  
15 Kit gehört auch eine Anleitung zur Durchführung des Verfahrens.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin die Nukleinsäuren, die sich für die Durchführung des  
20 Verfahrens besonders eignen.

- Gegenstand der Erfindung ist auch ein Satz von mindestens  
10 Oligomersonden (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren), die zur Detektion des Cytosin-  
25 Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) dienen. Mit diesen Sonden ist die Analyse eines Satzes genetischer und/oder epigenetischer Parameter zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen oder für die Diagnose der  
30 Prädisposition für bestimmte Erkrankungen möglich.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein mindestens 18 Basen langer Sequenzabschnitt einer  
behandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID  
35 40712. Diese 18 Basenpaare lange Abschnitte aus Seq. ID 1

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

29

bis Seq. ID 40712 werden für die Amplifikation der behandelten genomischen DNA benutzt. Als Detektoren für diese Abschnitte werden Oligomere mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden verwendet.

5

Die Oligomere enthalten bevorzugt mindestens ein CpG Dinukleotid. Das Cytosin des entsprechenden CpG Dinukleotids befindet sich in etwa im mittleren Drittel des Oligomers. Entscheidend ist, dass im jeweiligen Satz von Oligomeren für zumindest jedes der CpG Dinukleotide mindestens ein Oligonukleotid aus Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 vorhanden ist.

Die Oligomere werden bevorzugt auf einem Trägermaterial in einer fixierten Anordnung hergestellt, wobei mindestens ein Oligomer an eine feste Phase gekoppelt wird. Verfahren zur Bindung von Oligomersonden an Festphasen sind dem Fachmann bekannt.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang ferner, dass man zur Diagnose von genetischen und/oder epigenetischen Parametern der beanspruchten Nukleinsäuren (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) nicht einzelne CpG Dinukleotide, sondern die eine grosse Anzahl der in den Sequenzen vorhandenen CpG Dinukleotide analysieren muss. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind alle in den Sequenzen vorhandenen CpG Dinukleotide zu untersuchen.

Wiederum bevorzugt ist es, dass alle Oligomersonden die gleiche Länge haben. Besonders bevorzugt sind weiterhin alle 18mere, welche ein CG Dinukleotid in der Mitte

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

30

aufweisen und die an eine der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 ohne Basenfehlpaarungen hybridisieren.

- In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens werden mindesten zehn der Oligomere zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) in chemisch vorbehandelter genomischer DNA verwendet.
- 10 Die Oligomere werden vorzugsweise verwendet zur Diagnose von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, Krebserkrankungen, CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Erkrankungen, aggressiven Symptomen oder Verhaltensstörungen, klinischen, psychologischen und sozialen Folgen von Gehirnverletzungen, psychotische
- 15 Störungen und Persönlichkeitsstörungen, Demenz und/oder assoziierten Syndromen, kardiovaskulärer Krankheit, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des gastrointestinalen Traktes, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des Atmungssystems, Verletzung, Entzündung,
- 20 Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen, endokrine und metabolische
- 25 Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung, Kopfschmerzen und sexuellen Fehlfunktionen durch Analyse von Methylierungsmustern.
- 30 Auch von den im Sequenzprotokoll aufgelisteten Nukleinsäuren oder erheblichen Teilen davon (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) wird vorzugsweise mindestens eine

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

31

verwendet für die Analyse eines Satzes genetischer und/oder epigenetischer Parameter zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen oder für die Diagnose der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen.

5

Dem Fachmann wird verständlich sein, dass die Oligomere bei einem Austausch von Thymin gegen Uracil in den verwendeten Sequenzen den gleichen Zweck erfüllen.

- 10 Die zu analysierende genomische 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,
- 15 Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch
- 20 Nukleinsäuren, umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein
- 25 Oligomer (Oligonukleotid oder Peptide Nucleic Acid (PNA)-Oligomer) zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter DNA, umfassend jeweils mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an eine chemisch
- 30 vorbehandelte DNA (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) hybridisiert. Dabei ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Basensequenz mindestens ein CpG Dinukleotid umfasst. Bevorzugt ist dabei auch, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids in etwa im mittleren Drittel des
- 35 Oligomers befindet.



- Gegenstand der Erfindung ist auch ein Satz von erfindungsgemäßen Oligomeren, umfassend mindestens ein Oligomer für zumindest eines der CpG Dinukleotide einer der Sequenzen der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712. Bevorzugt ist dabei, ein Satz von Oligomeren, umfassend für jedes der CpG Dinukleotide aus einer der Sequenzen der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 mindestens ein Oligomer.
- 10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Satz von mindestens zwei Nukleinsäuren, die als Primeroligonukleotide zur erfindungsgemäßen Amplifikation mindestens einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 oder Abschnitten davon eingesetzt werden. Dabei ist bevorzugt,
- 15 dass mindestens ein Oligonukleotid an eine Festphase gebunden ist.
- Gegenstand der Erfindung ist auch ein Satz von Oligomersonden zur Detektion des Cytosin-
- 20 Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) in chemisch vorbehandelter genomischer DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712, umfassend mindestens zehn der erfindungsgemäßen oben genannten Oligomere.
- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung einer auf einem Trägermaterial fixierten Anordnung von unterschiedlichen Oligomeren (Array) zur Analyse von in Zusammenhang mit dem
- 30 Methylierungszustandes der CpG Dinukleotide einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 stehenden Erkrankungen, bei dem mindestens ein Oligomer erfindungsgemäß an eine feste Phase gekoppelt wird.

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

33

Gegenstand der Erfindung sind auch an eine Festphase gebundene Anordnungen von unterschiedlichen erfindungsgemäßen Oligomeren (Array).

- 5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Array von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen wobei diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind. Bevorzugt ist dabei, dass die
- 10 Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

- Erfindungsgemäß ist auch ein DNA- und/oder PNA-Array zur
- 15 Analyse von in Zusammenhang mit dem Methylierungszustand von Genen stehenden Erkrankungen, der mindestens eine erfindungsgemäße wie oben beschriebene Nukleinsäure beinhaltet.

- 20 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1:

Herstellung von nicht- und aufmethylierter DNA und Bisulphit-Behandlung

- 25 Für die Herstellung aufmethylierter DNA wurden humane genomische DNA mit S-Adenosylmethion und der CpG Methylase (SssI, New England Biolabs, ) nach Angaben des Herstellers behandelt. Für die Herstellung nicht-
- 30 methylierter DNA wurde das Genfragment ELK-1 (Accession number ep59011) mit den Primer GCTCTATGGTCTTGTCTAACCCTA und AGGTGGTGGTGGCGGTGG ausgehend von humaner genomischer DNA, mittels PCR amplifiziert. Die so hergestellte nicht- und aufmethylierte DNA, wie auch humane genomische DNA,
- 35 wurde unter Verwendung von Bisulphit (Hydrogensulfit,

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

34

Disulfit) derart behandelt, 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 für die Reaktion Bisulfit im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 M und 6 M verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen.

15

Beispiel 2:

Herstellung der Cy5-markierten Sonden

Ausgehend von den Bisulphit behandelten DNA Proben wird je ein definiertes Fragment der Länge 529 bp aus der Promoterregion des ELK-1 Gens amplifiziert (Accession number ep59011). Die Amplifikation wird mit den Primeroligonukleotiden ATGGTTTGTGTTAATYGTAGAGTTGTTT und TAAACCCRAAAAAAAAAACCAATAT durchgeführt. Durch Verwenden von Primeroligonukleotiden, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert sind, wird das Fragment direkt bei der PCR markiert. Als Matrix DNA wird Bisulphit (Hydrogensulfit, Disulfit) behandelte (1) nichtmethylierte, (2) aufmethylierte und (3) humane genomische DNA verwendet. Anschließend werden diese drei unterschiedlichen DNA-Fragmente in getrennten Hybridisierungen auf ihren Methylierungsgrad an einer spezifischen CpG Position untersucht.

35

Beispiel 3:

Durchführung der Hybridisierung und Auswertung eines hybridisierten DNA-Chip

- 5 Die in Beispiel 2 hergestellte Gensonden wird auf einem DNA Chip hybridisiert. Auf dem Chip sind zuvor Oligonukleotide immobilisiert worden. Die Oligonukleotidesequenzen leiten sich von dem in Beispiel 2 genannten amplifizierten Fragment des Gens ELK-1 ab, und repräsentierten die CG Dinukleotide, die unmittelbare Umgebung einschließend. Die Länge der Oligonukleotide beträgt 14-22 Nukleotide, die Position des CG Dinukleotides innerhalb der Oligonukleotide ist variabel.
- 10 Nach der Hybridisierung wird der DNA Chip gescannt (siehe Fig. 1) und die Hybridisierungssignale numerisch ausgewertet (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis der Hybridisierung für die Oligonukleotide CTACTCAACGAAACAAA und CTACTCAACAAAAACAAA wird in Fig. 1 und Fig. 2 gezeigt. Hierbei hybridisiert CTACTCAACGAAACAAA bevorzugt, wenn
- 15 das zu Cytosin des ELK-1 Fragments, welches sich an Position 103 des Amplifikates befindet, methyliert ist, CTACTCAACAAAAACAAA wenn dieses Cytosin nicht-methyliert ist.
- 20 In Figur 1 ist ein DNA Chip nach Hybridisierung mit dem ELK-1 Fragment dargestellt. Dargestellt ist das Falschfarben-Bild wie es nach dem Scannen erzeugt wird. Entgegen der hier dargestellten schwarz-weiß Abbildung wird von dem Scanner ein farbiges Bild erzeugt. Die Intensität der verschiedenen Farben repräsentiert den
- 25 Grad der Hybridisierung, wobei der Hybridisierungsgrad von rot (in Figur 1 als helle Spots zu erkennen) nach blau (in Figur 1 als dunkle Spots zu erkennen) abnimmt.
- 30 Figur 2 A stellt eine Teilabbildung von Figur 1 dar. Zur Verdeutlichung des Hybridisierungsschemas sind die
- 35

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

36

gespotteten Oligonukleotidpaare weiß umrandet:  
ctactcaacaaaaacaaa (links) und ctactcaacgaaaaacaaa  
(rechts).

- 5 Teilabbildung Figur 2 B zeigt das Spottingmuster für einen unbekannten Methylierungsstatus der Gewebeprobe und Teilabbildung Figur 2 C den Methylierungsstatus für die aufmethylierte Vergleichsprobe.

10 Tabelle 1:

	Probe A (unmethyliert)		Probe B (unbekannt)		Probe C (aufmethyliert)	
Sequenz des Detektionsoligomers	Fluoreszenz (counts)	Mittelwert	Fluoreszenz (counts)	Mittelwert	Fluoreszenz (counts)	Mittelwert
ctactcaacgaaaaacaaa	3362		6102		6002	
ctactcaacgaaaaacaaa	2950		6775		7898	
ctactcaacgaaaaacaaa	4196		6360		7485	
ctactcaacgaaaaacaaa	5181		5521		11401	
		3920		6190		8197
ctactcaacaaaaacaaa	20577		7074		7290	
ctactcaacaaaaacaaa	19709		9171		9985	
ctactcaacaaaaacaaa	24130		7603		9286	
ctactcaacaaaaacaaa	21601		9434		12435	
		21504		8321		9749
CG/CA		0,28		0,74		0,84

- Der Mittelwert ist jeweils für eine Wellenlänge von 635 nm angegeben. In Spalte A werden die Werte für die unmethylierte Probe, in Spalte B für einen unbekannten Methylierungsstatus einer Gewebeprobe und in Spalte C die Werte für die aufmethylierte Vergleichsprobe. Die CG/CA Verhältnisse repräsentieren den Methylierungsstatus der jeweiligen Probe. Der Wert von 0,74 zeigt, dass die Probe im wesentlichen in aufmethylierter Form vorliegt.

Beispiel 4:

Das folgende Beispiel bezieht sich auf ein Fragment des mit dem vererbaren non-polyposis Colorektalkrebs assoziierten Gens hMLH1, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung untersucht wird.

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart behandelt, 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 für die Reaktion Bisulfit im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 M und 6 M verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen. Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschließend eine Desulfonierung der DNA (10-30 min, 90-100 °C) bei alkalischem pH-Wert durchgeführt. Im dritten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Im vorliegenden Beispiel werden Cytosine des Gens hMLH1, hier aus einer 1551 bp großen 5' flankierenden Region, untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden AGCAACACCTCCATGCACTG und TTGATTGGACAGCTTGAAATGC ein definiertes Fragment der Länge 719 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

38

einer Festphase gebundenes Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise GAAGAGCGGACAG, wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 588 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primeroligonukleotiden, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt.

15 Beispiel 5:

Herstellung von durch Bisulfit modifizierter DNA durch Agarose beads

In dem vorliegenden Experiment wird, ausgehend von mit Bisulfit behandelter DNA, ein definiertes Fragment der Länge 529 bp aus der Promoterregion des ELK-1 Gens (Accession number ep59011) amplifiziert. Durch Verwenden der Primeroligonukleotide ATGGTTTGTGTTAATYGTAGAGTTGTTT und TAAACCCRAAAAAAAAAACCAATAT, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff ALEXA 488 markiert sind, wird das Fragment direkt bei der PCR markiert. Oligonukleotide der ersten Klasse (hier beispielsweise ATTAATAGCGTTTGGTT) und der zweiten Klasse (hier: beispielsweise ATTAATAGTGTGTTGGTT) werden an den Oberflächen von beads immobilisiert, die sich durch eine individuelle Farbkodierung unterscheiden. In einem folgenden Schritt werden die mit den oben genannten Primeroligonukleotiden hergestellten Amplifikate des Gens ELK-1, mit einem Gemisch beider Klassen der beads zusammengebracht, wobei die Amplifikate gegen die immobilisierten Oligonukleotide, hier beispielsweise ATTAATAGCGTTTGGTT

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

39

und ATTAATAGTGTGGTT, wobei sich das nachzuweisende C bzw. T jeweils an Position 476 des Amplifikats befindet, hybridisieren. Anschließend werden die beads vereinzelt, dann durch Fluoreszenzmessung anhand ihrer Farbkodierung identifiziert und durch Messung der Fluoreszenzintensitäten, die spezifisch für den Fluoreszenzfarbstoff ALEXA 488 sind, der Grad der Hybridisierung ermittelt.

#### 10 Beispiel 6:

Verwendung von multiplen Farbstoffen zur internen Kalibrierung

Ausgehend von mit Bisulfit behandelter DNA wird ein definiertes Fragment der Länge 529 bp aus der Promoterregion des ELK-1 Gens amplifiziert. Durch Verwenden fluoreszenzmarkierter Primeroligonukleotide ATGGTTTGTGTTAATYGTAGAGTTGTTT und TAAACCCRAAAAAAAAAACCAATAT, wird das Fragment direkt bei der PCR markiert. Für die PCR Reaktion, die auf einem Thermocycler (Eppendorf GmbH) durchgeführt wird, werden 10 ng von mit Bisulfit behandelter DNA, 6 pmol je Primer, 200 µM je dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 U HotstartTaq (Qiagen AG) eingesetzt. Die übrigen Bedingungen werden den Herstellerangaben gemäß gewählt. Für die Amplifikation wird eine Denaturierung für 14 min bei 96°C durchgeführt, woran sich 39 Zyklen mit den Bedingungen 60 sec bei 96°C, 45 sec bei 55 °C und 75 sec bei 72 °C anschließen. Zum Schluss wird eine Elongation für 10min bei 72°C durchgeführt. Im vorliegenden Fall werden die zu untersuchenden Proben, hier Gewebe von gesunden und kranken Personen, mit dem Farbstoff Cy2 markiert. Zur internen Kalibrierung des Methylierungsstatus werden Primeroligonukleotide zur Amplifikation der Proben für die Kalibrierung verwendet, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert sind. Die



WO 02/18632

PCT/EP01/19074

40

Amplifikate aus den Proben für die Kalibrierung repräsentieren einen bekannten Methylierungsstatus, zum einen, einen Zustand hundertprozentiger Methylierung und zum anderen einen nicht-methylierten Zustand. Da bei diesem Verfahren die Verhältnisse der Farbtintensitäten der Fluoreszenzfarbstoffe, die unter Verwendung des ScanArray 4000XL, Packard BioScience-BioChip Technologies, gemessen werden, zwischen zwei Klassen von Oligonukleotiden, hier beispielsweise ATTAATAGCGTTTGGTT und ATTAATAGTGTGTTGGTT, wobei sich das nachzuweisende C bzw. T jeweils an Position 476 des Amplifikats befindet, berechnet werden, kann, das Verhältnis von methyliertem zu nicht methyliertem Zustand der unbekannten Proben ermittelt werden.

15

#### Beispiel 7:

Verwendung von multiplen Farbstoffen zur Erhöhung des Probendurchsatzvolumens und zur Erhöhung der Analysekomplexität

20

Das vorliegende Experiment dient dazu, verschiedene Proben in einem einzigen Hybridisierungsschritt zu analysieren und dadurch das Probendurchsatzvolumen zu erhöhen. Dazu wird von vier Individuen jeweils aus der Promotorregion des Gens ELK-1 jeweils ein definiertes Fragment der Länge 529 bp ausgehend von mit Bisulfit behandelte DNA, mit den Primeroligonukleotiden ATGGTTTGTGTTAATYGTAGAGTTGTTT und TAAACCCRAAAAAAAAAACCAATAT, amplifiziert. Diese von den vier Individuen stammenden Fragmente werden mit den vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen Cy3, Cy5, Cy2 und Cy7 markiert und gegen immobilisierte Oligonukleotide, hier beispielsweise ATTAATAGCGTTTGGTT und ATTAATAGTGTGTTGGTT, wobei sich das nachzuweisende C bzw. T jeweils an Position 476 des Amplifikats befindet, hybridisiert. Diese verschieden fluoreszenzmarkierten Proben werden

35

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

41

anschließend bei unterschiedlichen Wellenlängen analysiert, ohne dass es zu einer gegenseitigen, auf einer Fluoreszenzfarbstoff basierenden Beeinflussung, kommt.

- 5 Umgekehrt ist es auch möglich, aus einer DNA Probe verschiedene unterschiedliche Sätze von Fragmenten zu erzeugen, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, hier Cy2, Cy3 und Cy5. Wird ein Satz von Oligonukleotidsonden für 64 Gene (Satz 1) auf einem Chip
- 10 immobilisiert, so ist die Spezifität ausreichend, um 64 z.B. Cy3 markierte Fragmente unabhängig voneinander zu analysieren. Dadurch, dass hier Proben von Satz 1 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 und Proben von Satz 2 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert werden (und Satz 3
- 15 mit Cy2), wird die Detektion des Methylierungsstatus über die Fragmente des Satzes 1 bei der Messung der Fluoreszenzintensitäten nicht durch die fluoreszenzmarkierten Amplifikate der Sätze 2 und 3 beeinflusst (und umgekehrt). Damit ist es möglich, trotz
- 20 erhöhter Komplexität der Amplifikate gleichermaßen zuverlässige Daten zu erzeugen wie bei einer Komplexität von 64 Amplifikaten.

Beispiel 8:

- 25 Verwendung von multiplen Farbstoffen zur Verifizierung der experimentellen Reproduzierbarkeit.

In dem vorliegenden Experiment werden gleiche PCR-Amplifikate mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

30 markiert und diese in 4 facher Redundanz verifiziert. Dazu wird, ausgehend von mit Bisulfit behandelter DNA, ein definiertes Fragment der Länge 529 bp aus der Promoterregion des ELK-1 Gens mit den Primeroligonukleotiden ATGGTTTGTGTTAATYGTAGASTTGTTT und

35 TAAACCCRAAAAAAAAAACCAATAT, amplifiziert und gegen immobilisierte Oligonukleotide, hier beispielsweise

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

42

- ATTAAATAGCGTTTGGTT und ATTAAATAGTGTGGTT, wobei sich das nachzuweisende C bzw. T jeweils an Position 476 des Amplifikats befindet, hybridisiert. Durch Verwenden von mit Cy3, Cy5, Cy2 und Cy7 fluoreszenzmarkierten
- 5 Primeroligonukleotiden werden die Verhältnisse der unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Proben verglichen und auf diese Weise eine höhere experimentelle Sicherheit erzielt.

10

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

43

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades eines bestimmten Cytosins im Sequenzkontext 5'-CpG-3' einer genomischen DNA-Probe, dadurch gekennzeichnet, dass
- 5 a) man die genomische DNA chemisch behandelt, wobei man die Cytosinbasen in Uracil umwandelt, nicht aber die 5-Methylcytosinbasen;
- 10 b) man Teile der genomischen DNA amplifiziert, die das besagte bestimmte Cytosin enthalten, wobei die Amplifikate eine nachweisbare Markierung erhalten;
- 15 c) man die Amplifikate an zwei Klassen von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren mit jeweils mindestens einem Mitglied hybridisiert;
- 20 d) man das Ausmaß der Hybridisierung der Amplifikate an die zwei Klassen von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren durch Detektion der Markierung der Amplifikate bestimmt;
- 25 e) man aus dem Verhältnis der an den zwei Klassen von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren in Folge der Hybridisierung detektierten Markierungen auf den Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA-Probe schließt.
- 30 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die
- 35 Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

44

- der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus
- 5 der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine Hybridisierung der
- 10 Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz
- 15 hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA
- 20 hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von dem Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der
- 25 genomischen DNA hybridisieren.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren
- 30 (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte
- 35 bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche

- aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von dem Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.
- 5
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man das Verfahren nicht nur mit der genomischen DNA-Probe durchführt, sondern sinngemäß auch mit bekanntermaßen an der Position des besagten bestimmten Cytosins methyliert oder aber unmethyliert vorliegender Standard-DNA, wobei die jeweils mit der unmethylierten Standard DNA gemäß Anspruch 1 gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen als Eichwert für einen Methylierungsgrad von 0 und entsprechend die jeweils mit der methylierten Standard DNA gemäß Anspruch 1 gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen als Eichwert für einen Methylierungsgrad von 1 dienen und man diese Eichwerte für die Bestimmung des Methylierungsgrades der genomischen Proben-DNA einsetzt.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man weitere bekannte Standard DNA-Proben zur Eichung verwendet, die jeweils einen beliebigen bekannten Methylierungsgrad des besagten bestimmten Cytosins aufweisen.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die als Standard verwendeten DNAs jeweils unterschiedlich markiert sind und die

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

46

Probe (das aus einer genomischen DNA entsprechend Anspruch 1 hergestellte Amplifikat) wiederum mit einer davon verschiedenen Markierung versehen ist.

- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass Amplifikate, hervorgegangen aus verschiedenen genomischen DNA-Proben, mit unterschiedlichen Markierungen versehen sind.
- 10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass Amplifikate, hervorgegangen aus derselben genomischen DNA-Proben, mit unterschiedlichen Markierungen versehen sind, um über eine Mittelung der aus verschiedenen
- 15 Detektionsverfahren erhaltenen Werte eine Erhöhung der Messgenauigkeit zu erreichen.
10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Markierungen
- 20 Fluoreszenzmarkierungen sind.
11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die chemische Behandlung mit einer Lösung eines Bisulfits
- 25 (=Hydrogensulfit, Disulfit) durchführt.
12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für die Amplifikation Oligonukleotide verwendet werden, die einen
- 30 mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 umfassen.
13. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
- 35 dadurch gekennzeichnet, dass in einem

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

47

- Hybridisierungsschritt Oligonukleotide und /oder  
Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligomere verwendet  
werden, die an einen mindestens 9 Basen langen  
Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA  
gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712  
hybridisieren oder diesem entsprechen, wobei die  
Basensequenz mindestens ein CpG Dinukleotid umfaßt  
und sich das CpG Dinukleotid in etwa im mittleren  
Drittel des Oligomers befindet.
14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass man besagte Markierung  
durch ihre Chemilumineszenz, ihre UV-Absorption oder  
Fluoreszenzpolarisation nachweist.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch  
gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide  
sind.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch  
gekennzeichnet, dass die Markierungen ablösbare  
Massenmarkierungen sind, die in einem  
Massenspektrometer nachgewiesen werden.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch  
gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte insgesamt  
oder deren charakteristische Fragmente im  
Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre  
Masse eindeutig charakterisiert sind.
18. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere  
(Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) einer Klasse  
die Sequenz 5'-CG-3' umfassen.



WO 02/18632

PCT/EP01/10074

48

19. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere  
{Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere} einer Klasse  
die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3'  
5 umfassen.
20. Verfahren nach den Ansprüchen 18 und 19, dadurch  
gekennzeichnet, dass die Oligomere {Oligonukleotide  
und/oder PNA-Oligomere} der ersten Klasse die Sequenz  
10 5'-CG-3' umfassen und die Oligomere der zweiten  
Klasse die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-  
CA-3' umfassen.
21. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
15 dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere der ersten  
und der zweiten Klasse auf einer gemeinsamen  
Festphase immobilisiert sind.
22. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,  
20 dass die Oligonukleotide auf einer ebenen Festphase  
in einem rechtwinkligen oder hexagonalen Raster  
angeordnet sind und der Ort bestimmter  
Oligonukleotide auf der Festphase mit deren  
jeweiliger Sequenz korreliert ist.
- 25 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-20, dadurch  
gekennzeichnet, dass die Oligomere der ersten und  
zweiten Klasse auf Beads immobilisiert sind, welche  
mit einem Satz getrennt nachweisbarer Markierungen  
30 codiert sind.
24. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche  
dadurch gekennzeichnet, dass man den Schritt b) des  
Anspruchs 1 in zwei Teilschritten wie folgt  
35 durchführt:

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

49

- a) eine PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, die an eine nach Anspruch 1 vorbehandelte DNA-Probe unspezifisch hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein Amplifikat ergeben;
- b) eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Sequenz, die jeweils zu einem Abschnitt der nach Anspruch 1 vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-)-Strang] identisch oder revers komplementär sind und an die zu amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.
25. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wird.
26. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für die Amplifikation eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet wird.
27. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die für die Amplifikation verwendeten Primeroligonukleotide der entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.
28. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 10 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden.
29. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 50 CpG

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

50

Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext  
gleichzeitig analysiert werden.

30. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
5 dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 100 CpG  
Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext  
gleichzeitig analysiert werden.
31. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
10 dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 500 CpG  
Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext  
gleichzeitig analysiert werden.
32. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
15 dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 1000 CpG  
Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext  
gleichzeitig analysiert werden.
33. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,  
20 wobei die genomische DNA-Probe aus Zelllinien, Blut,  
Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit,  
in Paraffin eingebettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe  
von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge,  
25 Brust oder Leber, histologischen Objektträgern oder  
allen möglichen Kombinationen hiervon erhalten wurde.
34. Verwendung eines Verfahrens nach einem der  
voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder  
Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder  
30 Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse  
mindestens einer der folgenden Kategorien angehören:  
unerwünschte Arzneimittelwirkungen;  
Kreislauferkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder  
Krankheit; Aggressionssymptome oder  
35 Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und  
soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen;

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

51

- psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen;  
 Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre  
 Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion,  
 Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen  
 5 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  
 10 Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes  
 oder der Knochen; endokrine und metabolische  
 Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit;  
 Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
- 15 35. Verwendung eines Verfahrens nach einem der  
 voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von  
 Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der  
 Zelldifferenzierung.
- 20 36. Kit, umfassend ein Bisulfit enthaltendes Reagenz,  
 Primeroligonukleotiden zur Herstellung der  
 Amplifikate und/oder vorzugsweise an einer Festphase  
 immobilisierte Oligonukleotiden gemäß Anspruch 10  
 sowie eine Anleitung zur Durchführung eines  
 25 Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche.
37. Nukleinsäure, umfassend einen mindestens 18 Basen  
 langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten  
 DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712.  
 30
38. Oligomer (Oligonukleotid oder Peptide Nucleic Acid  
 (PNA)-Oligomer) zur Detektion des Cytosin-  
 Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter  
 DNA, umfassend jeweils mindestens eine Basensequenz  
 35 mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an

WO 02/19632

PCT/EP01/10074

52

eine chemisch vorbehandelte DNA (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) hybridisiert.

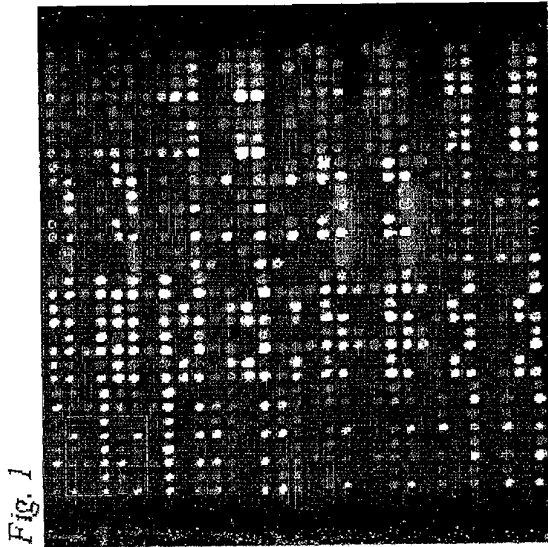
- 5 39. Oligomer gemäß Anspruch 38, wobei die Basensequenz mindestens ein CpG Dinukleotid umfaßt.
- 10 40. Oligomer gemäß Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids in etwa im mittleren Drittel des Oligomers befindet.
- 15 41. Satz von Oligomeren gemäß Anspruch 39, umfassend mindestens ein Oligomer für zumindest eines der CpG Dinukleotide einer der Sequenzen der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712.
- 20 42. Satz von Oligomeren gemäß Anspruch 41, umfassend für jedes der CpG Dinukleotide aus einer der Sequenzen der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 mindestens ein Oligomer.
- 25 43. Satz von mindestens zwei Nukleinsäuren, die als Primeroligonukleotide zur Amplifikation gemäß Anspruch 1 mindestens einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 oder Abschnitten davon eingesetzt werden.
- 30 44. Satz von Oligonukleotiden gemäß Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligonukleotid an eine Festphase gebunden ist.
- 35 45. Satz von Oligomersonden zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) in chemisch vorbehandelter genomischer DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712, umfassend mindestens zehn der Oligomere gemäß einem der Ansprüche 38 bis 40.

WO 02/18632

PCT/EP01/10074

53

46. Verfahren zur Herstellung einer auf einem Trägermaterial fixierten Anordnung von unterschiedlichen Oligomeren (Array) zur Analyse von in Zusammenhang mit dem Methylierungszustand der CpG Dinukleotide einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 stehenden Erkrankungen, bei dem mindestens ein Oligomer gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4 an eine feste Phase gekoppelt wird.
47. An eine Festphase gebundene Anordnung von unterschiedlichen Oligomeren (Array) nach einem der Ansprüche 38 bis 40.
48. Array von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen gemäß Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.
49. Array gemäß einem der Ansprüche 47 oder 48, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.
50. DNA- und/oder PNA-Array zur Analyse von in Zusammenhang mit dem Methylierungszustand von Genen stehenden Erkrankungen, der mindestens eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 38 bis 40 beinhaltet.



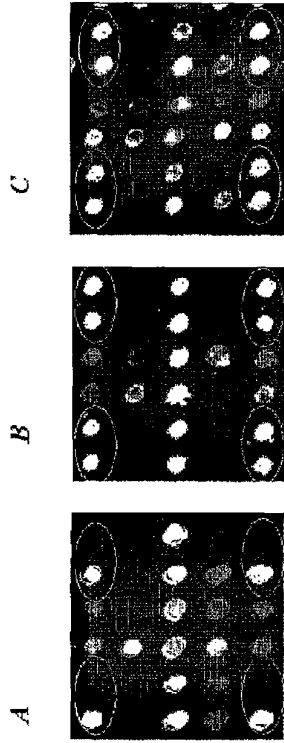
ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 02/18632

2/2

PCT/EP01/10074

Fig. 2



ERSATZBLATT (REGEL 26)



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
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 33/58	G 0 1 N 33/58	A
	C 1 2 N 15/00	F

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

(72)発明者 ピーペンブロック, クリスチャン  
ドイツ国、デー - 1 0 1 1 5 ベルリン、シュバルツコッフシュトラッセ 7 ベー

(72)発明者 ベルリン, クルト  
ドイツ国、デー - 1 4 5 3 2 スターンスドルフ、マリーエンケーフェルベーク 4

(72)発明者 ギューティグ, ダビット  
ドイツ国、デー - 1 0 4 3 5 ベルリン、カスタンニーンアレー 7 4

Fターム(参考) 2G045 AA35 DA13 FB02 FB07 FB12 GC15  
2G054 CA22 EA03 GA04  
4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 HA14 HA19  
4B029 AA07 FA12  
4B063 QA13 QA19 QQ42 QR32 QR55 QR83 QS34 QX02 QX04 QX07

专利名称(译)	确定基因组DNA上序列背景5-CpG-3中特定胞嘧啶甲基化程度的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004516821A</a>	公开(公告)日	2004-06-10
申请号	JP2002522537	申请日	2001-09-01
[标]申请(专利权)人(译)	埃皮吉諾米克斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	外延基因组学公司		
[标]发明人	オレクアレクサンダー ピーペンブロッククリスチャン ベルリンクルト ギューティグダビット		
发明人	オレク,アレクサンダー ピーペンブロック,クリスチャン ベルリン,クルト ギューティグ,ダビット		
IPC分类号	G01N27/62 A61K31/70 B01J19/00 C12M1/00 C12N15/09 C12N15/11 C12P19/34 C12Q C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C12Q1/6827 C12Q1/6883 C12Q2600/154		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N27/62.V G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.A C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/CA22 2G054 /EA03 2G054/GA04 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063 /QR83 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX04 4B063/QX07		
优先权	10043826 2000-09-01 DE 10044543 2000-09-05 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

特表2004-5 (P2004-51) (43) 公表日 平成16年6月10日(2004)																																																					
摘要(译)																																																					
确定存在于DNA ( I ) 的基因组样品中的基序5′-CpG-3′;中特定胞嘧啶的甲基化程度是新的。确定存在于DNA ( I ) 的基因组样品中的基序5′-CpG-3′;中特定胞嘧啶的甲基化程度是新的。化学处理样品以将胞嘧啶 ( C ) 而非甲基化的C转化为尿嘧啶，然后扩增含有靶C的部分 ( I ) 以形成标记的扩增子 ( II ) 。																																																					
( II ) 与寡核苷酸和/或肽 - 核酸 ( PNA ) 寡聚体 ( A ) 的两个类别 ( 每个具有至少一个成员 ) 杂交，并且从 ( II ) 上的标记确定两类杂交程度。根据与两类 ( A ) 杂交的标记的比例，计算甲基化程度。以下还包括独立权利要求： ( 1 ) 包括a的套件亚硫酸氢盐，用于扩增的引物寡核苷酸，和/或 ( A ) ，优选固定在固相上，加上说明书； ( 2 ) 核酸，其包含来自序列 ( 1 ) - ( 40712 ) 的化学预处理的DNA ( B ) 的至少18个碱基，未在说明书中给出； ( 3 ) 用于新方法的寡核苷酸或PNA寡聚体 ( OG ) ，其包含能够与 ( B ) 杂交的至少9个核苷酸 ( nt ) 的序列； ( 4 ) 套OG； ( 5 ) 组至少两种引物寡核苷酸，用于扩增至少一种 ( B ) 或其片段； ( 6 ) 用于测定 ( B ) 中C甲基化程度和/或单核苷酸多态性的寡核苷酸探针组，包含至少10个OG； ( 7 ) 通过将OG附着于固相，制备不同OG的载体结合阵列，用于分析与 ( B ) 的甲基化状态相关的疾病；和 ( 8 ) 数组由 ( 7 ) 制作。																																																					
<table><tr><td>(51) Int. Cl. 7</td><td>F I</td><td>テーマコード (参考)</td></tr><tr><td>C 1 2 N 15/09</td><td>C 1 2 N 15/00</td><td>Z N A A 2 G 0 4 5</td></tr><tr><td>C 1 2 M 1/00</td><td>C 1 2 M 1/00</td><td>A 2 G 0 5 4</td></tr><tr><td>C 1 2 Q 1/68</td><td>C 1 2 Q 1/68</td><td>A 4 B 0 2 4</td></tr><tr><td>G 0 1 N 21/78</td><td>G 0 1 N 21/78</td><td>C 4 B 0 2 9</td></tr><tr><td>G 0 1 N 27/62</td><td>G 0 1 N 27/62</td><td>V 4 B 0 6 3</td></tr><tr><td colspan="3">審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 81 頁) 最終頁</td></tr></table>		(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 0 4 5	C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 5 4	C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4	G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 21/78	C 4 B 0 2 9	G 0 1 N 27/62	G 0 1 N 27/62	V 4 B 0 6 3	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 81 頁) 最終頁																																	
(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 0 4 5																																																			
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 5 4																																																			
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4																																																			
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 21/78	C 4 B 0 2 9																																																			
G 0 1 N 27/62	G 0 1 N 27/62	V 4 B 0 6 3																																																			
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 81 頁) 最終頁																																																					
<table><tr><td>(21) 出願番号</td><td>特願2002-522537 (P2002-522537)</td><td>(71) 出願人</td><td>500247105</td></tr><tr><td>(86) (22) 出願日</td><td>平成13年9月1日 (2001. 9. 1)</td><td></td><td>エビゲノミクス アーゲー</td></tr><tr><td>(85) 翻訳文提出日</td><td>平成14年9月5日 (2002. 3. 5)</td><td></td><td>ドイツ国、デー-1 0 4 3 5 ベル!</td></tr><tr><td>(86) 国際出願番号</td><td>PCT/EP2001/010074</td><td></td><td>カスターニーンアレー 2 4</td></tr><tr><td>(87) 国際公開番号</td><td>W02002/018632</td><td>(74) 代理人</td><td>100093735</td></tr><tr><td>(87) 国際公開日</td><td>平成14年3月7日 (2002. 3. 7)</td><td></td><td>弁理士 荒井 雄司</td></tr><tr><td>(31) 優先権主張番号</td><td>100 43 826. 1</td><td>(74) 代理人</td><td>100105429</td></tr><tr><td>(32) 優先日</td><td>平成12年9月1日 (2000. 9. 1)</td><td></td><td>弁理士 河野 尚孝</td></tr><tr><td>(33) 優先権主張国</td><td>ドイツ (DE)</td><td>(74) 代理人</td><td>100108143</td></tr><tr><td>(31) 優先権主張番号</td><td>100 44 543. 8</td><td></td><td>弁理士 嶋崎 英一郎</td></tr><tr><td>(32) 優先日</td><td>平成12年9月5日 (2000. 9. 5)</td><td>(72) 発明者</td><td>オレク, アレクサンダー</td></tr><tr><td>(33) 優先権主張国</td><td>ドイツ (DE)</td><td></td><td>ドイツ国、デー-1 0 1 1 5 ベル!</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td>シュレンダーシュトラッセ 1 3</td></tr></table>		(21) 出願番号	特願2002-522537 (P2002-522537)	(71) 出願人	500247105	(86) (22) 出願日	平成13年9月1日 (2001. 9. 1)		エビゲノミクス アーゲー	(85) 翻訳文提出日	平成14年9月5日 (2002. 3. 5)		ドイツ国、デー-1 0 4 3 5 ベル!	(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/010074		カスターニーンアレー 2 4	(87) 国際公開番号	W02002/018632	(74) 代理人	100093735	(87) 国際公開日	平成14年3月7日 (2002. 3. 7)		弁理士 荒井 雄司	(31) 優先権主張番号	100 43 826. 1	(74) 代理人	100105429	(32) 優先日	平成12年9月1日 (2000. 9. 1)		弁理士 河野 尚孝	(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100108143	(31) 優先権主張番号	100 44 543. 8		弁理士 嶋崎 英一郎	(32) 優先日	平成12年9月5日 (2000. 9. 5)	(72) 発明者	オレク, アレクサンダー	(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ国、デー-1 0 1 1 5 ベル!				シュレンダーシュトラッセ 1 3
(21) 出願番号	特願2002-522537 (P2002-522537)	(71) 出願人	500247105																																																		
(86) (22) 出願日	平成13年9月1日 (2001. 9. 1)		エビゲノミクス アーゲー																																																		
(85) 翻訳文提出日	平成14年9月5日 (2002. 3. 5)		ドイツ国、デー-1 0 4 3 5 ベル!																																																		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/010074		カスターニーンアレー 2 4																																																		
(87) 国際公開番号	W02002/018632	(74) 代理人	100093735																																																		
(87) 国際公開日	平成14年3月7日 (2002. 3. 7)		弁理士 荒井 雄司																																																		
(31) 優先権主張番号	100 43 826. 1	(74) 代理人	100105429																																																		
(32) 優先日	平成12年9月1日 (2000. 9. 1)		弁理士 河野 尚孝																																																		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100108143																																																		
(31) 優先権主張番号	100 44 543. 8		弁理士 嶋崎 英一郎																																																		
(32) 優先日	平成12年9月5日 (2000. 9. 5)	(72) 発明者	オレク, アレクサンダー																																																		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ国、デー-1 0 1 1 5 ベル!																																																		
			シュレンダーシュトラッセ 1 3																																																		
最終頁に																																																					