

C12Q 1/68 (2018.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKAÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2021-389
 (22) Přihlášeno: 20.08.2021
 (40) Zveřejněno: 16.03.2022
 (Věstník č. 11/2022)
 (47) Uděleno: 02.02.2022
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: 16.03.2022
 (Věstník č. 11/2022)

(56) Relevantní dokumenty:

PIERI, Massimo, et al.: Serum amyloid A protein as a useful biomarker to predict COVID-19 patients severity and prognosis. *International Immunopharmacology*, 2.3.2021, Vol. 95, p. 107512, ISSN 1567-5769; URIELI-SHOVAL, Simcha, et al.: Widespread expression of serum amyloid A in histologically normal human tissues: Predominant localization to the epithelium. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1998, Vol. 46, No. 12, p. 1377-1384, ISSN 0022-1554; SOLER, L., et al.: Serum amyloid A measurements in saliva and serum in growing pigs affected by porcine respiratory and reproductive syndrome in field conditions. *Research in Veterinary Science*, 2012, Vol. 93, p. 1266-1270, ISSN 0034-5288; LI, Huan, et al.: Serum amyloid A protein is a biomarker of severe Coronavirus Disease and poor prognosis. *Journal of Infection*, 2020, Vol. 80, p. 646-655, ISSN 0163-4453; HAROUN, Riham Abdel-Hamid, et al.: Interferon- γ -induced protein 10 (IP-10) and serum amyloid A (SAA) are excellent biomarkers for the prediction of COVID-19 progression and severity. *Life Sciences*, 14.1.2021, Vol. 269, p. 119019, ISSN 0024-3205; FU, Jun, et al.: The value of serum amyloid A protein for predicting the severity and recovery of COVID-19. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, Vol. 40, No. 4, p. 3571-3577, ISSN 1792-0981.

(73) Majitel patentů:

GeneSpector Innovations s.r.o., Praha 1, Nové
Město, CZ

(72) Původce:

prof. Ing. Kmoch Stanislav, CSc., Praha 1, Staré
Město, CZ

Ing. Lenka Piherová, Ph.D., Praha 9, Letňany, CZ

RNDr. Hana Hartmannová, Ph.D., Koberovy, CZ

Ing. Michal Pohludka, Ph.D., MBA, LL.M.,

Olomouc, Hejčín, CZ

RNDr. Martin Radina, Starý Jičín, CZ

(74) Zástupce:

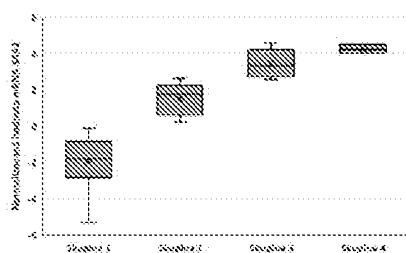
MACHU IP | patentová kancelář, Mgr. Matěj

Machů, Ph.D., Václavské náměstí 804/58, 110 00

Praha 1, Nové Město

(54) Název vynálezu:

**Způsob predikce závažnosti průběhu
infekčního onemocnění a biomarker pro
použití při provádění tohoto způsobu a
monitoringu terapie infekčního onemocnění**



Způsob predikce závažnosti průběhu infekčního onemocnění a biomarker pro použití při provádění tohoto způsobu a monitoringu terapie infekčního onemocnění

5 Oblast techniky

Vynález spadá do oblasti analýzy nukleových kyselin pomocí molekulárně biologických metod, specificky kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR), dále do oblasti testování spojeného s mikroorganismy, specificky viry, bakteriemi a plísněmi, a do oblasti zkoumání biologických materiálů.

Dosavadní stav techniky

15 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR, Quantitative Polymerase Chain Reaction) je laboratorní metoda sloužící k odhadu počtu kopií vybraných úseků nukleových kyselin ve zkoumaném materiálu pomocí sledování efektivity množení vybraných úseků DNA, jejíž široké využití zahrnuje příkladně studium nukleových kyselin, genovou analýzu a diagnostiku, sekvenování genetické informace či diagnostiku infekčních chorob. Princip PCR spočívá v tepelné
20 denaturaci DNA obsažené ve vzorku následované vazbou specifických primerů na uvolněná vlákna DNA a syntézou nových vláken s pomocí enzymu polymerázy. Tyto kroky se v cyklech pravidelně opakují a s každým cyklem dojde ke zdvojení množství DNA obsaženého ve vzorku. Varianta qPCR spojená s reverzní transkripcí (RT-qPCR, Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction) umožňuje stanovení přítomnosti specifické RNA, kterou enzym reverzní
25 transkriptáza přítomný v reakční směsi před samotnou amplifikací přepíše do komplementární DNA. RT-qPCR našla v posledních letech uplatnění mimo jiné jako diagnostická metoda infekčních onemocnění způsobených RNA viry vynikající vysokou citlivostí i specifitou.

Během pandemie infekce viru SARS-CoV-2 a jím způsobeného onemocnění Covid-19 došlo k výraznému navýšení analytických kapacit státních i veřejných laboratoří a RT-qPCR se stala
30 běžnou diagnostickou metodou, přičemž primárním zdrojem vzorků je neinvazivní výtěr z nosohltanu. Metoda RT-qPCR umožňuje velmi přesně určit přítomnost a počet molekul virové RNA (virovou nálož) v organismu diagnostikovaného pacienta. Tento parametr je vyjadřován hodnotou Ct (Cycle Threshold, prahový cyklus). Hodnota Ct má však pouze diagnostický význam.
35 Vzhledem ke specifickému charakteru onemocnění Covid-19 nedokáže hodnota Ct určit či předpovědět jeho další klinický průběh. Nízká virová nálož (demonstrována vyšší hodnotou Ct) může být zjištěna u pacientů s následně závažným průběhem onemocnění, a naopak v řadě případů je vysoká virová nálož (demonstrována nízkými hodnotami Ct) zjištěna u jedinců, kteří nemají ani se u nich v budoucnu nerozvinou žádné klinické příznaky respiračního onemocnění.

40 Průběh infekce SARS-CoV-2 doposud nelze spolehlivě predikovat. Také pro přechod do vleklého průběhu nemoci (takzvaný post-COVID syndrom) nejsou známy spolehlivé prediktivní biomarkery. Z klinických rizikových faktorů jsou významné pro závažný průběh zejména starší věk, některé chronické nemoci a ve středním věku mužské pohlaví, obezita, diabetes a hypertenze.
45 Velice pravděpodobně však záleží i na jiných faktorech hostitele, zejména těch, které jsou geneticky dány a podílí se na vrozené i získané imunitní odpovědi organismu proti infekci SARS-CoV-2. Významným patogenetickým mechanismem rozvoje systémového postižení je v případě infekčních onemocnění, a tedy i nemoci Covid-19, cytokinová bouře. Za tohoto stavu postupně dochází k nekontrolovatelnému uvolňování prozánětlivých cytokinů, aktivaci proteinů akutní fáze
50 a abnormální mobilizaci imunitního systému, v jejichž důsledku dochází k poškození plic, akutnímu poškození jater a selhání ledvin. Včasně rozpoznání rozvíjející se cytokinové bouře vytváří prostor pro její modulaci a tím i pro prevenci rozvoje závažných klinických stavů.

Ideálním prediktivním biomarkerem jsou obecně molekuly, které jsou hojně zastoupeny v primárním diagnostickém materiálu, které jsou snadno měřitelné, a jejichž hladiny se v závislosti na klinickém stavu zkoumané osoby rychle a významně mění.

5 Z literatury (příkladně Chen *et al.*, *Am. J. Transl. Res.* 2020, 12 (8), 4569-4575) je známa metoda predikce závažnosti průběhu onemocnění Covid-19 sledováním hladin zánětlivých indikátorů, specificky C-reaktivního proteinu (CRP), sérového amyloidu A (SAA), prokalcitoninu (PCT) a interleukinu-6, v krevním séru. Tyto takzvané proteiny akutní fáze jsou syntetizovány téměř výhradně v hepatocytech. Jejich produkce je stimulována během infekcí nebo v průběhu
10 zánětlivých stavů širokým spektrem prozánětlivých cytokinů, zejména interleukinu-6 (IL-6), interleukinu-1 β (IL-1 β), tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α , Tumor Necrosis Factor α), interferonu- γ (IFN- γ), transformujícího růstového faktoru (TGF- β , Transforming Growth Factor) a pravděpodobně i interleukinu-8 (IL-8), a řadou transkripčních faktorů (NF κ B, C/EBP, YY1, AP-2, SAF a Sp1), které regulují produkci cytokinů. Podobná metoda je taktéž diskutována v
15 dokumentu Pieri M., *et al.*, *Int. Immunopharmacol.* 2021, 95, 107512. Popisované metody mají ovšem řadu nedostatků, především je to nutnost invazivního odběru vzorku, při kterém dochází k narušení tkáně, složité analýzy hladin jednotlivých indikátorů a komplikované vyhodnocení vzájemných vztahů těchto hodnot, a jsou tedy nevhodné pro masové nasazení v diagnostice.

20 Dokument Ziegler *et al.*, *Cell* 2021 popisuje cytologickou analýzu výtěru z nosohltanu Covid-19-pozitivních pacientů zaměřenou na tvorbu širokého komplexu látek spojených se signálními drahami cytokinů a interferonů. Je zde diskutována i možnost predikce závažného průběhu onemocnění, jelikož na rozdíl od pacientů s lehkým a středním průběhem, u kterých bylo pozorování zvýšení exprese tohoto souboru signálních látek, u pacientů s vážným průběhem byly
25 hodnoty nízké a srovnatelné s kontrolní skupinou Covid-19-negativních jedinců. Nevýhodou této metody je, stejně jako v předchozím případě, nutnost charakterizace a stanovení obsáhlé množiny indikátorů s komplikovanými vzájemnými vztahy a s ní spojená analytická náročnost, která metodu činí nevhodnou pro diagnostické použití. Nelineární charakter závislosti koncentrace indikátorů na průběhu onemocnění dále z principu neumožňuje tuto metodu využít ke sledování účinnosti
30 nasazené terapie v kontextu ústupu onemocnění.

Dokument diskutovaný v předchozím odstavci mimo jiné popisuje i stanovení SAA ve vzorcích od Covid-19-pozitivních pacientů, přičemž bylo pozorováno, že v rámci jednoho vzorku je tvorba SAA1 a SAA2 snížena v buňkách přímo zasažených virem SARS-CoV-2, a naopak zvýšena v
35 sousedních buňkách virem nezasazených. Tato nekonzistentnost a skutečnost, že dle informací dostupných v expresních knihovnách nebyla exprese kteréhokoli z rodiny *SAA* genů a s ní spojená přítomnost mediátorové RNA (mRNA, messenger RNA) dosud pozorována ve sliznici nosohltanu, specificky byla pozorována pouze v prsní tkáni, výstelce trávicí soustavy, slinivce, prostatě, plicích, kůži a mozku (příkladně dokument Urieli-Shoval S. *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.*, 1998,
40 46(12), 1377-1384), povede odborníka v dané oblasti k závěru, že sérový amyloid A není vhodným indikátorem k predikci závažnosti průběhu onemocnění Covid-19.

Mimo krevní oběh a fyziologicky nejbliže nosohltanu byla přítomnost proteinu SAA pozorována příkladně v prasečích slinách (dokument Soler L. *et al.*, *Res. Vet. Sci.*, 2012, 93, 1266-1270). Jak
45 bylo uvedeno výše, protein SAA samotný je široce studovanou složkou imunitní odpovědi, přičemž jeho hladiny není možné korelovat s hladinami mRNA SAA.

Úkolem předkládaného vynálezu je vyvinout metodu predikce závažnosti průběhu onemocnění Covid-19 a dalších infekčních onemocnění v primárním diagnosticky používaném klinickém
50 materiálu - výtěru z nosohltanu - která nevyžaduje paralelní nebo následný invazivní odběr jiného typu klinického vzorku (například krve nebo bronchoalveolární laváže), je jednoduchá v kontextu analytického provedení a je založena na stanovení jednoho konkrétního indikátoru, jehož zvýšení hladiny je možné pozorovat ještě před nástupem symptomů a jehož hodnota je přímo úměrná závažnosti průběhu onemocnění, což dále umožňuje sledování průběhu nasazené terapie.

55

Podstata vynálezu

Vynález je založen na stanovení množství mRNA sérového amyloidu A, výhodně *SAA1*, metodou RT-qPCR ve vzorku získaném výtěrem z nosohltanu, čímž odstraňuje všechny nedostatky dosavadního stavu techniky. Sledování hladin mRNA *SAA1* ve výtěru z nosohltanu splňuje všechna kritéria ideálního prediktivního biomarkeru. Experimenty prokázaly, že mRNA *SAA1* je za fyziologického stavu ve výtěru z nosohltanu přítomna a její hladina je metodou RT-qPCR snadno měřitelná. Hladiny mRNA *SAA1* rostou bezprostředně po infekci a jejich výše se v závislosti na

10 míře a rozsahu zánětu mění v rozsahu 3 řádů (>1000).

SAA1 je apolipoprotein kódovaný genem *SAA1* charakterizovaným následující nukleotidovou sekvencí:

```

15  AGGCTCAGTATAAATAGCAGCCACCGCTCCCTGGCAGGCAGGGACCCGCA
    GCTCAGCTACAGCACAGATCAGGTGAGGAGCACACCAAGGAGTGATTTTT
    AAAACTTACTCTGTTTTCTCTTTCCCAACAAGATTATCATTTTCCTTTAAA
    AAAAATAGTTATCCTGGGGCATAACAGCCATACCATTCTGAAGGTGTCTTA
    TCTCCTCTGATCTAGAGAGCACCATGAAGCTTCTCACGGGCCTGGTTTTC
20  TGCTCCTTGGTCTGGGTGTCAGCAGCCGAAGCTTCTTTTCGTTTCCTTGG
    CGAGGCTTTTGATGGGGCTCGGGACATGTGGAGAGCCTACTCTGACATGA
    GAGAAGCCAATTACATCGGCTCAGACAAATACTTCCATGCTCGGGGGAAC
    TATGATGCTGCCAAAAGGGACCTGGGGGTGCCTGGGCTGCAGAAGTGAT
    CAGCGATGCCAGAGAGAATATCCAGAGATTCTTTGGCCATGGTGC GGAGG
25  ACTCGCTGGCTGATCAGGCTGCCAATGAATGGGGCAGGAGTG GCAAAGAC
    CCCAATCACTCCGACCTGCTGGCCTGCCTGAGAAATACTGAGCTTCCTC
    TTCACTCTGCTCTCAGGAGATCTGGCTGTGAGGCCCTCAGGGCAGGGATA
    CAAAGCGGGGAGAGGGTACACAATGGGTATCTAATAAATACTTAAGAGGT
    GGAATTTGTGGAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

30 Lokalizace: (GRCh/hg19) chr11:18287772-18291523

Tento protein je primárně syntetizován v játrech a je uvolňován do krevního oběhu v reakci na zánětlivé podněty způsobené infekcí, traumatem, autoimunitním onemocněním či rakovinou. Ve velmi malém množství byla mRNA *SAA1* nalezena i v jiných tkáních, například tukové tkáni, cévní stěně, střevě, plicích a slezině.

RT-qPCR analýza výtěru z nosohltanu je standardem, který je neinvazivní, rychlý, jednoduchý na provedení a umožňuje snadnou automatizaci. Tento postup se běžně používá nejen pro diagnostiku infekce SARS-CoV-2 a onemocnění Covid-19, ale i pro diagnostiku jiných infekčních onemocnění stanovením přítomnosti a kvantifikaci množství pro virus či mikroorganismus specifických nukleových kyselin ve vzorku. Jelikož je možné díky citlivosti metody jeden vzorek otestovat na přítomnost více než jedné cílové nukleové kyseliny, je možné získat zavedeným a prověřeným postupem nejen informaci o tom, zda je jedinec pozitivní na dané virové či jiné infekční onemocnění, ale díky paralelnímu stanovení mRNA *SAA1* i o tom, jak závažný bude mít onemocnění průběh. Vzhledem k tomu, že sérový amyloid A je univerzálním indikátorem zánětlivé fáze, je zároveň možné v případě negativního výsledku virologické analýzy a zvýšených hodnot mRNA *SAA1* získat indicii o jiné závažně probíhající infekci, která může být i bakteriálního či mykotického původu.

50 Roztok mRNA purifikované výhodně s použitím magnetických nanočástic se analyzuje pomocí jedнокrokové RT-qPCR reakce probíhající v přítomnosti reverzní transkriptázy, DNA polymerázy, jednotlivých primerů a sond v zařízení udržujícím ideální teplotní podmínky pro jednotlivé kroky, které se cyklicky opakují. Po ukončení každého kroku se vždy měří fluorescence směsi, přičemž cyklus se obvykle opakuje celkem 40 až 45-krát a po ukončení programu se odečtou hodnoty Ct

v jednotlivých kanálech, které odpovídají původnímu počtu molekul sledovaných nukleových kyselin ve výtěru v nosohltanu.

5 Aby bylo možné výsledek analýzy mRNA *SAA1* kvantifikovat a zároveň se zamezilo zkreslení výsledku danému odběrem rozdílných množství a složení vzorku během výtěru z nosohltanu, je paralelně stanoveno množství mRNA vybraného konstitutivně exprimovaného genu, ke kterému je množství mRNA *SAA1* vztahováno a normalizováno. Konstitutivně exprimované geny jsou geny zajišťující základní fyziologické funkce buňky, a jsou tedy aktivní a exprimované v konstantním množství bez ohledu na stav a typ buňky. Počet molekul vybraného konstitutivně exprimovaného
10 genu tak vyjadřuje počet buněk přítomných v odebraném materiálu. Příkladem takového genu je *UBC*, tedy gen kódující bílkovinu ubiquitin C. Normalizace probíhá odečtem hodnoty Ct získané RT-qPCR analýzou mRNA *UBC* ve vzorku výtěru z nosohltanu od hodnoty Ct získané RT-qPCR analýzou mRNA *SAA1* v téže vzorku.

15 Dle experimentálně získaných dat je mRNA *SAA1* přítomna ve vzorcích získaných výtěrem z nosohltanu u všech pacientů, včetně těch bez probíhajícího zánětu způsobeného infekcí, přičemž její hladina je zvýšena v případě probíhajícího zánětu a zároveň je přímo úměrná závažnosti jeho průběhu. V případě závažných symptomů vyžadujících hospitalizaci je zvýšení hladiny mRNA *SAA1* pozorovatelné až několik dnů před jejich nástupem. Tím je potvrzena i prediktivní funkce
20 tohoto indikátoru.

Na statisticky významném množství vzorků výtěru z nosohltanu bylo experimentálně zjištěno, že:

25 1) normalizované hodnoty množství mRNA *SAA1* menší než nula jsou spojeny s absencí probíhajícího zánětu spojeného s infekčním onemocněním; a

2) normalizované hodnoty množství mRNA *SAA1* vyšší než nula jsou spojeny s probíhajícím či rozvíjejícím se zánětem spojeným s infekčním onemocněním, přičemž hodnoty menší než jedna jsou zpravidla spojeny s mírným průběhem zánětu a s ním spojeného onemocnění a hodnoty vyšší než 2,5 jsou spojeny s vysokou pravděpodobností (95 %) rozvíjejícího se zánětu s vážným průběhem spojeným s budoucí nutností hospitalizace.

Metoda dle vynálezu je zároveň vhodná k monitorování účinnosti terapie nasazené při léčbě daného infekčního onemocnění. Bylo pozorováno, že po nasazení vhodné léčby dochází k následnému
35 snížení již aktuálně zvýšené hladiny mRNA *SAA1*, a to ještě před propuknutím predikovaných závažných symptomů. Tento způsob je výrazně přesnější než prosté sledování příznaků onemocnění, jelikož příkladně u onemocnění Covid-19 mohou symptomy respiračního onemocnění jako rýma či kašel přetrvávat i týdny po odeznění infekce SARS-CoV-2 a s ní spojeného zánětu.
40

Objasnění výkresů

45 Obrázek č. 1 zobrazuje graf hladin *SAA1* normalizovaných na konstitutivně exprimovaný gen *UBC* u pacientů rozdělených do skupin dle následujícího klíče:

- Skupina 1 – Zdraví jedinci a SARS-CoV-2-pozitivní jedinci s bezpříznakovým průběhem onemocnění
- 50 • Skupina 2 – Jedinci s mírným až středně těžkým průběhem infekčního onemocnění bez nutnosti hospitalizace
- Skupina 3 – Hospitalizovaní jedinci s těžkým průběhem infekčního onemocnění

- Skupina 4 – Jedinci s život ohrožujícím průběhem infekčního onemocnění hospitalizovaní na jednotce intenzivní péče

5 V grafu je patrná průměrná hodnota (bod), medián (linie) a interval spolehlivosti CI 95 % (obdélník).

Příklady uskutečnění vynálezu

10 Příklad 1

Příklad popisuje nukleotidové sekvence primerů a sondy použité na stanovení přítomnosti mRNA genu *SAA1* a dále sekvence primerů a sondy použité na stanovení přítomnosti mRNA genu *UBC* (konstitutivně exprimovaný gen kódující bílkovinu ubiquitin C).

15

Primery a sonda použité na stanovení přítomnosti mRNA genu *SAA1*:

SAA1_upper 5'TCGGGGGA ACTATGATGCT'3

Lokalizace: (GRCh/hg19) chr11:18290818-18290836

SAA1_lower 5'GCACCATGGCCAAAGAATC'3

20 Lokalizace: (GRCh/hg19) chr11:18291287-18291305

SAA1_sonda: 5'HEX ATCAGCGATGCCAGAGAGAATATCCA BHQ1'3

Lokalizace: (GRCh/hg19) chr11:18291261-18291284

Primery a sonda použité na detekci přítomnosti mRNA genu *UBC*:

25 UBC_upper 5'GATCGCTGTGATCGTCACTTG'3

Lokalizace: (GRCh/hg19) chr12:125399133-125399153

UBC_lower 5'GTTTTCCAGCAAAGATCAGCCT'3

Lokalizace: (GRCh/hg19) chr12:125398173-125398194

UBC_sonda: 5'Cy5 TCGTGAAGACTCTGACTGGTAAGACC BHQ2'3

30 Lokalizace: (GRCh/hg19) chr12:125398282-125398307

Příklad 2

35 Příklad popisuje provedení RT-qPCR analýzy stanovující množství mRNA *SAA1* ve vzorku výtěru z nosohltanu normalizované na paralelně stanovené množství mRNA konstitutivně exprimovaného genu *UBC*.

40 Izolace mRNA probíhá v roztoku za přítomnosti vyšší koncentrace chaotropních solí, která způsobí nekovalentní vazbu na hydroxy-silanem potažené magnetické částice. mRNA navázaná na magnetické částice se promyje roztoky obsahujícími ethanol nebo isopropanol a uvolní do roztoku neobsahujícího žádný alkohol ani chaotropní soli. Získaná mRNA se rovnou použije do jedнокrokové RT-qPCR reakce. Tato reakce probíhá v přítomnosti MMLV reverzní transkriptázy, dNTPs, hořčičných solí, BSA, hot-start polymerázy, 1,6 μ M jednotlivých primerů a 0,2 μ M sond uvedených v příkladu 1. Reverzní transkripce probíhá 10 minut při 50 °C, ihned následuje 10ti minutová denaturace při 95 °C, kdy se deaktivuje MMLV reverzní transkriptáza a zároveň aktivuje hot-start polymeráza. Následuje polymerázová řetězová reakce probíhající za následujících podmínek: denaturace při 95 °C po dobu 10 s a annealing a extenze při 58 °C po dobu 30 s. Po ukončení tohoto kroku se vždy měří fluorescence v kanálech HEX a Cy5. Tento cyklus se opakuje celkem 45-krát. Po ukončení programu se odečtou hodnoty Ct v jednotlivých signálech. V rámci 50 jednoho vzorku se získá hodnota Ct v kanálu HEX (*SAA1*) a v kanálu Cy5 (*UBC*). Tyto hodnoty odpovídají expresi jednotlivých proteinů ve výtěru z nosohltanu. Normalizovaná hodnota mRNA *SAA1* se získá odečtením hodnoty Ct mRNA *UBC* od hodnoty Ct mRNA *SAA1*.

Příklad 3

5 Příklad demonstruje realizovanou predikci závažnosti průběhu onemocnění u SARS-CoV-2-
pozitivního pacienta s využitím mRNA *SAA1* jako markeru.

10 Vzorek získaný výtěrem z nosohltanu jedince, který vykazuje symptomy počínajícího respiračního
onemocnění, se otestuje metodou RT-qPCR jednak na přítomnost virové RNA SARS-CoV-2 a
jednak na přítomnost mRNA *SAA1* dle postupu popsaného v příkladu č. 2. Získaná hodnota Ct
(hraniční počet cyklů) RNA SARS-CoV-2 se rovná 20,46 a získaná normalizovaná hodnota mRNA
SAA1 se rovná 3,48. Po sedmi dnech u jedince nastává hospitalizace nejprve na infekčním oddělení
nemocnice a následující den dochází k přeložení na anesteziologicko-resuscitační oddělení.

Příklad 4

15 Příklad demonstruje realizované potvrzení účinnosti terapie onemocnění u SARS-CoV-2-
pozitivního pacienta s využitím mRNA *SAA1* jako markeru.

20 Vzorek získaný výtěrem z nosohltanu jedince, který vykazuje symptomy počínajícího respiračního
onemocnění, se otestuje metodou RT-qPCR jednak na přítomnost virové RNA SARS-CoV-2 a
jednak na přítomnost mRNA *SAA1* dle postupu popsaného v příkladu č. 2. Získaná hodnota Ct
RNA SARS-CoV-2 se rovná 21,79 a získaná normalizovaná hodnota mRNA *SAA1* se rovná 2,1.
Na základě tohoto zjištění se následně sledovanému jedinci injekčně podá terapeutická dávka
neutralizačních protilátek proti viru SARS-CoV-2 a po třech dnech se zopakuje RT-qPCR test
25 jednak na přítomnost virové RNA SARS-CoV-2 a jednak na přítomnost mRNA *SAA1* dle postupu
popsaného v příkladu 2. Získaná hodnota Ct RNA SARS-CoV-2 se rovná 29,00 a získaná
normalizovaná hodnota mRNA *SAA1* se rovná -2,21, tedy hodnotě menší než nula. Po dalších
čtyřech dnech se sada testů ještě jednou zopakuje, přičemž získaná hodnota Ct RNA SARS-CoV-
2 se rovná 39,64 a získaná normalizovaná hodnota mRNA *SAA1* se rovná -1,5, tedy hodnotě menší
30 než nula. Během sledování nedochází u pacienta k rozvoji závažných příznaků Covid-19.
Symptomy respiračního onemocnění v podobě rýmy a kašle však u něho přetrvávají po celou dobu
sledování a ještě po několik dalších týdnů.

Příklad 5

35 Příklad demonstruje realizovanou predikci závažnosti průběhu infekčního onemocnění neznámé
etiologie u SARS-CoV-2-negativního pacienta s využitím mRNA *SAA1* jako markeru.

40 Vzorek získaný výtěrem z nosohltanu jedince, který vykazuje symptomy počínajícího respiračního
onemocnění, se otestuje metodou RT-qPCR jednak na přítomnost virové RNA SARS-CoV-2 a
jednak na přítomnost mRNA *SAA1* dle postupu popsaného v příkladu č. 2. Přítomnost RNA SARS-
CoV-2 není potvrzena a získaná normalizovaná hodnota mRNA *SAA1* se rovná 3,58. Vyšetření
jedince na základě klinických symptomů odpovídajících infekčnímu onemocnění v podobě
zimnice, únavy a bolesti v krku následně odhalí diagnózu v podobě vážného případu bakteriální
45 angíny.

Příklad 6

50 Příklad demonstruje realizovanou predikci závažnosti průběhu infekčního onemocnění neznámé
etiologie u SARS-CoV-2-negativního pacienta s využitím mRNA *SAA1* jako markeru.

55 Vzorek získaný výtěrem z nosohltanu jedince, který vykazuje symptomy počínajícího infekčního
onemocnění, se otestuje metodou RT-qPCR jednak na přítomnost virové RNA SARS-CoV-2 a
jednak na přítomnost mRNA *SAA1* dle postupu popsaného v příkladu 2. Přítomnost RNA SARS-
CoV-2 není potvrzena a získaná normalizovaná hodnota mRNA *SAA1* se rovná 4,23. Vyšetření

jedinice na základě klinických symptomů odpovídajících infekčnímu onemocnění v podobě průjmů, zvracení a zvýšené teploty následně odhalí diagnózu v podobě mykózy způsobené kvasinkou *Candida albicans*, tedy plísňového onemocnění.

5

Průmyslová využitelnost

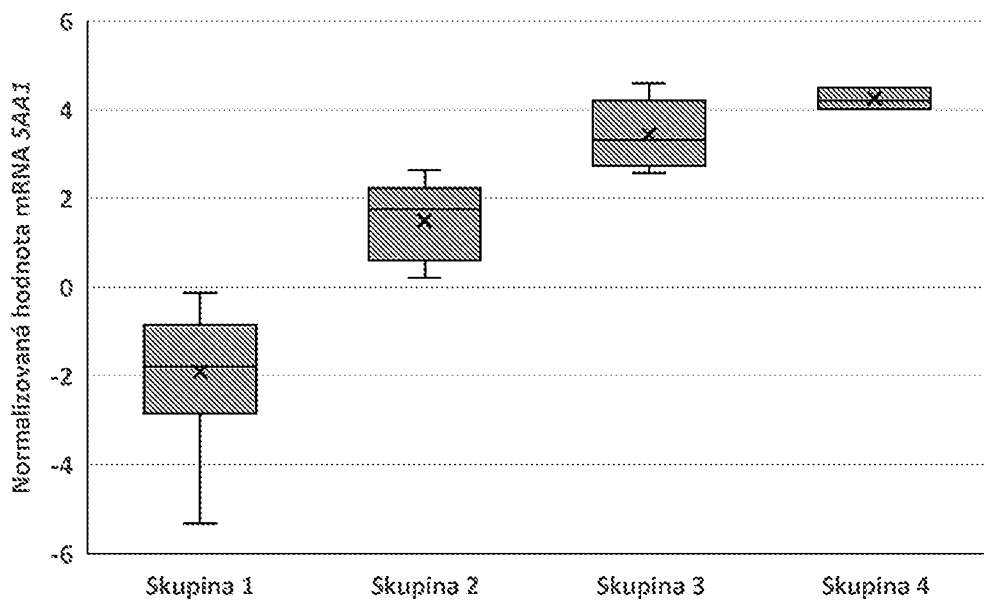
10 Způsob predikce závažnosti průběhu infekčního onemocnění a biomarker pro použití při provádění tohoto způsobu a monitoringu terapie infekčního onemocnění jsou průmyslově využitelné v diagnostice infekčních onemocnění v rámci laboratorní analýzy odebraných vzorků klinického materiálu.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Způsob predikce závažnosti průběhu infekčního onemocnění metodou RT-qPCR **vyznačující se tím**, že se provádí na vzorku výtěru z nosohltanu a zjišťuje se množství mRNA sérového amyloidu A.
2. Způsob podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že sérovým amyloidem A je SAA1.
- 10 3. Způsob podle nároku 1 nebo 2 **vyznačující se tím**, že množství mRNA sérového amyloidu A se normalizuje dle množství mRNA konstitutivně exprimovaného genu.
4. Způsob podle nároku 3 **vyznačující se tím**, že konstitutivně exprimovaným genem je *UBC*.
- 15 5. Použití mRNA sérového amyloidu A jako biomarkeru při predikci závažnosti průběhu infekčního onemocnění.
6. Použití mRNA sérového amyloidu A jako biomarkeru při monitoringu terapie infekčního onemocnění.

20

1 výkres



Obr. 1