

**(12) BELGISCHES ERFINDUNGSPATENT**

(47) Veröffentlichungsdatum : 22/08/2023

(21) Antragsnummer : BE2023/5240

(22) Anmeldetag : 30/03/2023

(62) Teilantrag des früheren Antrags :

(62) Anmeldetag des früheren Antrags :

(51) Internationale Klassifikation : C12Q 1/6883

(30) Prioritätsangaben :

(73) Inhaber :

**CHINA-JAPAN FRIENDSHIP HOSPITAL (INSTITUTE OF CLINICAL MEDICINE)**  
Krankenhaus  
100029 , BEIJING  
China

(72) Erfinder :

**LIU Min**  
100029 BEIJING  
China

**SUN Xuebiao**  
100029 BEIJING  
China

**MENG Xiapei**  
100029 BEIJING  
China

**TAO Xincao**  
100029 BEIJING  
China

**(54) Auf Biomarkern basierende Produkte zur Diagnose von pulmonaler Hypertonie (PH)  
und ihre Anwendungen**

(57)Die vorliegende Erfindung beschreibt Biomarkern basierende Produkte zur Diagnose von pulmonaler Hypertonie (PH) und ihre Anwendungen. Die Biomarker sind aus KCNA5, SPNS3 und PVALB entnommen. Im Vergleich zu normalen Kontrollen sind bei KCNA5, SPNS3, und PVALB signifikante Unterschiede zu erkennen, die wirksamen Ergebnisse der Diagnosen zeigen, wobei bei der Anwendung von KCNA5, SPNS3 und PVALB bei pulmonaler Hypertonie eine höhere Genauigkeit, Sensitivität und Spezifität erzielt werden.

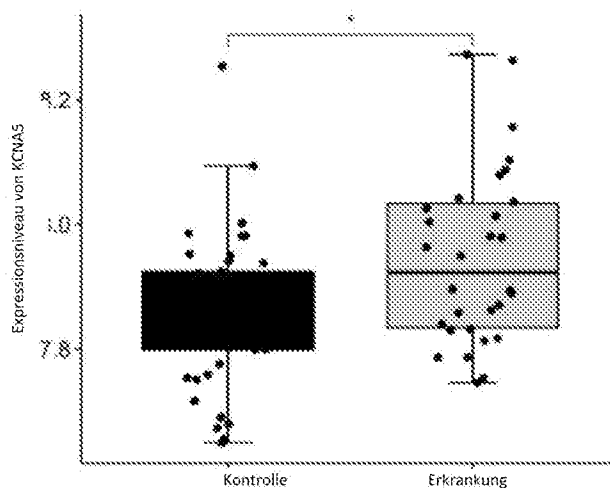


Fig. 1

## **Auf Biomarkern basierende Produkte zur Diagnose von pulmonaler Hypertonie (PH) und ihre Anwendungen**

### **Fachgebiet**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Biomedizin, und auf Biomarkern basierende Produkte zur Diagnose von pulmonaler Hypertonie (PH) und ihre Anwendungen.

### **Technischer Hintergrund**

10 Verschiedene Arten PH kommen immer klinisch mit gewissen Unterschieden zum Ausdruck, es gibt momentan noch keine einheitlichen Kriterien zur Diagnose, die im Allgemeinen eng mit der komorbiden Erkrankung und der Rechtherzfunktion zusammenhängt. Die aktuellen Herzkatheter- und bildgebenden Untersuchungen weisen bei der früheren PH-Diagnose Schwierigkeit auf. Deshalb ist die Suche nach neuen Biomarkern zur Ergänzung der aktuellen Diagnostik klinisch von großer Bedeutung.

15

### **Beschreibung der Erfindung**

Um die Mängel des aktuellen technischen Stand zu beheben, basierend auf der Verhalten- und Funktionsweise der Gene unter pulmonaler Hypertonie befasst sich die vorliegende Erfindung mit PH relevanten Biomarkern, um die Behandlung und Diagnose von PH auf neuem  
20 technischen Stand zu bringen.

Die vorliegende Erfindung stellt einerseits ein Produkt zum Diagnostizieren der PH zur Verfügung, das Produkt umfasst Reagenzien zur Bestimmung der KCNA5, SPNS3, und PVALB-Spiegel der Biomarkern in der Probe.

25 Des weiteren erfolgt die Bestimmung von KCNA5, SPNS3 und PVALB-Spiegel in der Probe durch die Bestimmung der Protein- und mRNA-Spiegel von KCNA5, SPNS3 und PVALB.

Des weiteren erfolgt die Bestimmung der Proteinspiegel von KCNA5, SPNS3 und PVALB in der Probe durch Immunfärbung, Immunfluoreszenz, Western-Blotting und ELISA-Verfahren.

30 Des weiteren erfolgt die Bestimmung des mRNA-Spiegels von KCNA5, SPNS3, und PVALB in der Probe durch Microarray, RNA-seq, In- situ- Hybridisierung, RNA-scope und reguläre halbquantitativen oder quantitativen RT-PCR Test.

Des weiteren umfasst das Produkt ein Reagenz zur Handhabung der Probe.

Andererseits findet die vorliegende Erfindung Anwendung zur Herstellung der diagnostischen Instrumente.

35 Drittens findet die vorliegende Erfindung Anwendung von Reagenzien zur Identifizierung von Biomarkern bei Herstellung von Produkten zur Diagnose der pulmonaler Hypertonie, der Biomarker umfasst KVN5, SPNS3, und PVALB.

Des weiteren umfasst das s.g. Reagenz Reagenzien zur Bestimmung der Biomarkerspiegel durch Sequenzierungsverfahren, Verfahren der Nukleinsäurehybridisierung, Amplifikationsverfahren der Nukleinsäuren und Proteinimmunoassay-Verfahren.

Des weiteren besteht das Reagenz aus folgenden: Sonden zur spezifischen Identifizierung der Biomarkern; Initiatoren zur spezifischen Amplifikation für Biomarker; oder Antikörper der Biomarkern aus spezifischer Kombination.

Des weiteren umfasst /ist nicht beschränkt auf die s.g. Probe nicht nur auf Gewebe oder Flüssigkeiten, sowie Gewebe, Blut, Plasma, Serum, Lymphe, Urin, seröse Hohlräumflüssigkeit, Rückenmarkflüssigkeit, Synovialflüssigkeit, Kammerwasser, Tränen, Speichel oder andere Bestandteile davon, oder vorbehandeltes Material.

Probe wird vorzugsweise aus Gewebe und Blut entnommen.

Nutzen der Erfindung:

Die vorliegende Erfindung ist dazu in der Lage, durch den Test auf die Expressionsniveaus von KCNA5, SPNS3, und PVALB die Diagnose zu einem früheren Zeitpunkt zu realisieren, die Sensitivität der Testung zu erhöhen, die Testfähigkeit- und Effizienz zu steigern, und sowie durch aktives Eingreifen, den PH-Verlauf zu verzögern, die Sterberate dementsprechend zu senken.

### **Beschreibung der Figuren**

Es zeigen

- Fig. 1: die Unterschiede der KCNA5 Genexpressionen;
- Fig. 2: die Unterschied der SPNS3 Genexpressionen;
- Fig. 3: die Unterschiede der PVALB Genexpressionen;
- Fig. 4: das ROC Diagramm der KCNA5 Gendiagnose der PH;
- Fig. 5: das ROC Diagramm der SPNS3 Gendiagnose der PH;
- Fig. 6: das ROC Diagramm der PVALB Gendiagnose der PH
- Fig. 7: das ROC Diagramm der KCNA5+SPNS3 Gendiagnose der PH;
- Fig. 8: das ROC Diagramm der KCNA5+ PVALB Gendiagnose der PH;
- Fig. 9: das ROC Diagramm der SPNS3+ PVALB Gendiagnose der PH;
- Fig. 10: das ROC Diagramm der KCNA5+ SPNS3+ PVALB kombinierte Gendiagnose der PH;

30

### **Detaillierte Beschreibung**

In der vorliegenden Erfindung umfasst der Biomarker KCNA5, SPNS3 und PVALB.

In der vorliegenden Erfindung umfasst KCNA5 (Kaliumspannungsgesteuerte Kanalunterfamilie A Mitglied 5, Gen-ID: 3741) das KCNA5-Gen und seine Homologe, Mutationen und Äquivalente.

SPNS3 (Sphingolipid Transporter 3, Gen-ID: 201305) umfasst das SPNS3-Gen und seine Homologe, Mutationen und Äquivalente.

PVALB (Parvalbumin, Gen-ID: 5816) umfasst das PVALB-Gen und seine Homologe, Mutationen und Äquivalente. Der Begriff umfasst unverarbeitetes PVALB in voller Länge sowie jede Form von PVALB, die aus der Verarbeitung in Zellen gewonnen wird.

Gen-IDs sind unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> verfügbar.

#### 5 Testen auf Nukleinsäure der Biomarkern

Durch Bestimmung der Transkriptionsspiegel der Nukleinsäuren der Biomarker sind Biomarker auszuwerten.

Nukleinsäuren werden durch schablonenabhängiges Amplifikationsverfahren amplifiziert, ein demonstratives Nukleinsäuren-Amplifikationsverfahren beruht auf PCR-Verfahren.

10 Bei gewissen günstigen Handhabungen bezieht sich die schablonenabhängige Amplifikation auf die Echtzeit-Quantifizierung der Transkripte. Zu den Instrumenten, die für die Erfassung und Analyse von Echtzeit-PCR-Daten verwendet werden, gehören normalerweise Thermocycler, Optiken für Fluoreszenzanregung und Emissionssammlung sowie optionale Computer- und Datenerfassungs- und Analysesoftware.

15 Die Verwendung von Blotting zur Quantifizierung von Zielnukleinsäuren ist den Fachleute gut bekannt.

Die Chip-Hybridisierung verwendet Biomarker-spezifische Oligonukleotide, die an feste Substrate gebunden sind, die aus körnigen festen Phasen bestehen können, die als Mikroarrays konzipiert sind, wie Nylonfilter, Objektträger oder Siliziumwafer. Microarrays sind dem Fachmann  
20 bekannt und bestehen aus Oberflächen, und Sonden, die Genprodukten (z. B. cDNA) mit Sequenz entsprechen, können spezifisch hybridisiert oder an bekannten Stellen auf diesen Oberflächen gebunden werden, um die Biomarker-Genexpression nachzuweisen.

Die Quantifizierung von Hybridisierungskomplexen ist auf dem Gebiet gut bekannt und kann durch eine von mehreren Methoden erreicht werden. Diese Verfahren basieren typischerweise  
25 auf dem Nachweis von Markern wie z. B. radioaktiven, fluoreszierenden, biologischen oder Enzym-markierungen oder Markern, die auf dem Gebiet gebräuchlich verwendet werden. Die Markierung kann bei Oligonukleotid-Sonden oder RNA aus biologischen Proben angewendet werden.

Im Allgemeinen kann die mRNA-Quantifizierung in Verbindung mit der Kalibrierkurve für eine  
30 genaue mRNA-Bestimmung durchgeführt werden. Weiterhin ist es bevorzugt, Transkripte aus biologischen Proben durch Vergleich mit Kontrollproben zu quantifizieren, die durch bekannte Expressionsmuster der untersuchten Transkripte gekennzeichnet sind.

#### Nachweis von Biomarker-Proteinen

Bei einigen Ausführungsformen werden krankheitsbehandelnde-Biomarker auf dem  
35 Proteinexpressionsniveau ausgewertet, indem das Vorhandensein eines Proteins (isoliert oder in Zellen) oder durch eine oder mehrere bekannte funktionelle Eigenschaften des Biomarkers nachgewiesen wird.

Bei einer besonderen Ausführungsform wird Immunfluoreszenz oder Immunzytochemie durchgeführt, um Proteine nachzuweisen.

5 Krankheitsbiomarker-spezifische Antikörper können direkt mit Fluoreszenzmarker, einschließlich Fluorescein, FITC, Rhodamin, Texas Red, Cy3, Cy5, Cy7 und andere fluoreszierende Marker, koppeln und den Filter unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachten, das mit einer geeigneten Linse ausgestattet ist. Antikörper können auch an Enzyme gekoppelt werden, die nach Zugabe des entsprechenden Substrats zu reagieren beginnen und mit dem nachgewiesenen Biomarker-Protein einen farbigen Niederschlag auf der Zelle bereitzustellen. Die Objektträger können dann mit einem Standard-Lichtmikroskop betrachtet werden. Alternativ  
10 können primäre Antikörper, die für krankheitsdiagnostische Biomarker spezifisch sind, weiter an sekundäre Antikörper gebunden werden, die an nachweisbare Fraktionen gekoppelt sind.

Die Immunhistochemie ist im Prinzip der Immunfluoreszenz oder Immunzytochemie sehr ähnlich, jedoch werden beispielsweise im Gegensatz zu Zellsuspensionen Gewebeproben mit Antikörpern untersucht, die für Biomarker zur Krankheitsbehandlung spezifisch sind. Die  
15 Biopsieprobe fixieren, verarbeiten und gegebenenfalls in Paraffin einbetten und ggf. schneiden, um einen Zell- oder Gewebeobjektträger bereitzustellen, der anschließend mit heparanase-spezifischen Antikörpern untersucht wird. Alternativ kann gefrorenes Gewebe auf einem Kryostaten geschnitten werden und eine Antikörpersondierung wird durchgeführt, um eine fixierungsinduzierte Antigenmaske zu vermeiden.

Bei anderen Ausführungsformen werden Assays wie ELISA und RIA verwendet, die einem  
20 ähnlichen Prinzip zum Nachweis spezifischer Antigene. Veränderungen können durch Spektrophotometrie leicht erkannt werden.

Die Protein-Biomarker-Expression kann auch durch Lumineszenz-Immunoassays nachgewiesen werden.

25 Die Western-Blotting-Analyse ist eine weitere Methode zur Bestimmung des Peptidgehalts von Krankheitsbiomarkern in biologischen Proben.

Bei einer besonderen Ausführungsform wird ein Proteinfangarray verwendet, das den gleichzeitigen Nachweis und/oder die Quantifizierung einer großen Anzahl von Proteinen ermöglicht.

30 Diagnostische Produkte

Die vorliegende Erfindung stellt ein Produkt zur Diagnose der pulmonaler Hypertonie bereit, das Produkt umfasst ein Reagenz zum Nachweis der Biomarker der vorliegenden Erfindung in einer Probe; und kann die Gebrauchsanweisung des genannten Produkts enthalten, um zu beurteilen, ob die Testperson pulmonale Hypertonie hat oder dafür anfällig ist.

35 Optional sind auch diagnostische Produkte erhältlich, die geeignete Reagenzien für die Detektionsmarkierung, Positiv- und Negativkontrollen, Waschlösungen, Löschmembranen, Mikrotitrationsplatten, Verdünnungspuffer und mehr enthalten.

Jede Form von Probenassay, der ermöglicht die darin beschriebenen Biomarker der Probe nachzuweisen kann verwendet werden.

Beispiel 1: Nachweis von PH-relevanten Biomarkern

#### 1. Probenentnahme

5 Blutproben von 7 Patienten mit chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie (CTEPH) und 5 gesunden Bevölkerungskontrollgruppen wurden gesammelt, und die grundlegenden Informationen von Patienten und gesunden Kontrollgruppen, einschließlich Alter, Geschlecht, BMI usw., wurden bei der Probenentnahme detailliert erfasst, unter denen es keine signifikanten Unterschiede zwischen Krankheitsgruppe und gesunder Gruppe in Alter, 10 Geschlecht, BMI usw. gab.

Einschlusskriterien für die Krankheitsgruppe: CTEPH-Diagnose durch Rechtsherzkatheteruntersuchung, Lungenbeatmungspertusionsuntersuchung oder CT-Lungenangiographie (CTPA). Die Diagnose von CTEPH erfordert die folgenden 3 Punkte gleichzeitig: ① wirksame Antikoagulationstherapie für mindestens 3 Monate, um subakute PTE 15 auszuschließen; ② Die V/Q-Szintigraphie zeigte mindestens einen Lungenperfusionsdefekt, oder die Computertomographie Pulmonar-Angiographie (CTPA), MRT oder direkte Lungenangiographie und andere Untersuchungen ergaben spezifische Anzeichen einer CTEPH, wie Ringstenose, Gitterzeichen und Lückenzeichen und arterielle Verschlüsse; ③ Der hämodynamische Index der Lungenzirkulation, gemessen durch 20 Rechtsherzkatheteruntersuchung, erfüllte die diagnostischen Kriterien der pulmonaler Hypertonie [mittlerer Lungenarteriendruck  $\geq 25$  mm Hg (1 mm Hg = 0,133 kPa), pulmonaler arterioller Keildruck  $\leq 15$  mm Hg].

Ausschlusskriterien für die Krankheitsgruppe: Vorhandensein von Durchblutungsstörungen wie Malignität, Bluthochdruck, Diabetes, koronare Herzkrankheit oder zerebrovaskuläre 25 Erkrankung.

Einschlusskriterien für gesunde Gruppen: einschließlich gesunder Kontrollen, die auf das Alter und Geschlecht der CTEPH-Gruppe abgestimmt sind, normale Blutroutine/Urinroutine/biochemischer Test/karzinembryonales Antigen (CEA)/Alpha-Fetoprotein (AFP)/Erythrozytensedimentationsrate (ESR)/Thoraxröntgen.

30 Ausschlusskriterien für gesunde Gruppen: Menschen mit einer Vorerkrankung, Kopftrauma und Operation, Herzchirurgie oder neurologischen Störungen mit der Vorgeschichte ausschließen.

#### 2. Experimentelle Methoden

##### 2.1 Extraktion der gesamten Blut-RNA

35 Die gesamte Blut-RNA mit dem PAXgene Blood RNA Kit von BD extrahieren und den Anweisungen folgen.

##### 2.2 Probenerkennung

Den Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Kit) verwenden, um die Gesamt-RNA-Konzentration, den RIN-Wert, 28S/18S und die Fragmentgröße zu bestimmen.

### 2.3 Datensammlung und Transkriptsequenzierung

5 1) DNase-Aufschluss zur Entfernung von DNA: DNase I wurde verwendet, um die in der gesamten RNA-Probe vorhandenen DNA-Fragmente zu verdauen, und die Reaktionsnebenprodukte wurden durch magnetische Perlenreinigung wiederverwertet und schließlich in DEPC-Wasser gelöst;

2) rRNA entfernen: die gesamte RNA-Probe nehmen, das Kit benutzen, um rRNA zu entfernen, und nach der Entfernung eine Agilent 2100-Detektion durchführen, um den rRNA-Entfernungseffekt zu überprüfen.

3) RNA-Unterbrechung: die vorherige Probe nehmen, den Unterbrechungspuffer hinzufügen und ihn zur thermischen Unterbrechung in das PCR-Instrument legen und auf 130-160nt unterbrechen;

15 4) Synthese des ersten Strangs der reversen Transkription: der unterbrochenen Probe eine geeignete Menge an Initiatoren hinzufügen, nach gründlicher Homogenisierung bei der Thermomixer Temperatur für einen bestimmten Zeitraum reagieren lassen, so dass die Sekundärstruktur geöffnet und mit den Initiatoren kombiniert wird, und dann wird das im Vorfeld vorbereitete einsträngige Synthesereaktionssystem hinzugefügt und die einsträngige cDNA wird auf dem PCR-Instrument nach dem entsprechenden Verfahren synthetisiert;

20 5) Synthese der zweisträngigen reversen Transkription: Herstellung eines zweisträngigen Synthesereaktionssystems, bei einer geeigneten Temperatur auf Thermomixer für einen bestimmten Zeitraum reagieren lassen, Synthese von zweisträngiger cDNA und die Reaktionsnebenprodukte werden gereinigt und mit magnetischen Kügelchen wiederverwertet.

25 6) Endreparatur: das Endreparaturreaktionssystem vorbereiten, bei einer geeigneten Temperatur im Thermomixer für einen bestimmten Zeitraum reagieren lassen und das klebrige Ende der cDNA reparieren, das durch umgekehrte Transkription unter Einwirkung von Enzymen erhalten wurde. Das Endprodukt wurde gereinigt und mit magnetischen Kügelchen zurückgewonnen, und schließlich wurde die Probe in EB-Lösung gelöst;

30 7) „A“ an das Ende der cDNA hinzufügen: das Reaktionssystem mit „A“ vorbereiten, für eine bestimmte Zeit bei einer geeigneten Temperatur im Thermomixer reagieren lassen und A-Basen zum 3'-Ende des Produkts der cDNA hinzufügen, die am Ende unter Einwirkung von Enzymen repariert wurden;

35 8) cDNA-Adapterverbindung: das Linkerligationsreaktionssystem vorbereiten, bei einer geeigneten Temperatur im Thermomixer für eine bestimmte Zeit reagieren lassen, unter der Einwirkung von Enzymen den Linker und mit eine Base verbinden, und das Produkt wird gereinigt und mit magnetischen Perlen wiederverwertet;

9) PCR-Reaktion und Produktrückgewinnung: das PCR-Reaktionssystem vorbereiten, das geeignete PCR-Reaktionsprogramm aussuchen, und die im vorherigen Schritt erhaltenen

Produkte amplifizieren. magnetische Perlenreinigung von PCR-Produkten. Das zurückgewonnene Produkt wird in EB-Lösung gelöst. Beschriftung, Datensammlung ist abgeschlossen;

10) Qualitätsprüfung der Datensammlung: den Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent DNA 5 1000Reagents) verwenden, um die Größe und Konzentration von Fragmenten in der Datensammlung zu erkennen.

11) Cyclisierung von PCR-Produkten: Nach der Denaturierung der PCR-Produkte in Einzelstränge ein Cyclisierungsreaktionssystem vorbereiten, nach gründlicher Homogenisierung bei der richtigen Temperatur für einen bestimmten Zeitraum reagieren lassen, einzelsträngige 10 Cycloprodukte erhalten und die linearen DNA-Moleküle verdauen, die nicht zyklisiert werden, d.h. die endgültige Datensammlung wird erhalten;

12) On-Machine-Sequenzierung: Einzelsträngige zirkuläre DNA-Moleküle werden durch Walzringe repliziert, um eine DNA-Nanokugel (DNB) mit mehr als 200 Kopien zu bilden. Die resultierenden DNBs werden den Netzporen auf dem Chip mithilfe der High-Density-DNA- 15 Nanochip-Technologie hinzugefügt. Durch Sequenzierung während der Synthese wurde die Sequenzierungsleselänge von 50bp/100bp erhalten.

#### 2.4 Qualitätskontrolle von Sequenzierungsdaten

Die ursprüngliche Sequenzierungsdaten wie folgt filtern, um qualitativ hochwertige Sequenzierungsdaten (saubere Daten) zu erhalten: die Adaptersequenz in Lesevorgängen 20 entfernen ; vor dem Schneiden Nicht-AGCT-Basen am 5'-Ende entfernen; das Lese-Ende mit niedrigerer Sequenzierungsqualität abschneiden (Sequenzierungsqualitätswert kleiner als Q20); Lesevorgänge entfernen, die 10% N enthalten. den Adapter verwerfen und kleine Fragmente mit einer Länge von weniger als 25 bp abschneiden.

#### 2.5 Abgleich mit Referenzgenomen

25 Die Parrissequenzierungsdaten wurden mit Hilfe der HISTAT2-Analysesoftware mit einem Referenzgenom verglichen. Das Referenzgenom stammt aus der Ensembl-Datenbank, die Genomversion ist GRCh38 und die Genannotationsinformationen sind Ensemble 92.

#### 2.6 Analyse des Genexpressionsniveaus

Das Expressionsniveau eines Gens wird berechnet, indem die Anzahl der Sequenzen (Clean 30 Reads) mit der Referenzgenomregion verglichen wird. Die Stringenz wird berechnet, basiert auf den Vergleichsergebnissen der Hisat2-Software, den FPKM-Wert jedes Gens / Transkripts in der Probe und diesen Wert als Expressionsmenge des Gens / Transkripts in der Probe verwenden.

#### 2.7 mRNA differentielle Expressionsanalyse

Unter Verwendung von DESeq2 zum Vergleich der Expressionsunterschiede von mRNA 35 zwischen der Kontrollgruppe und der Krankheitsgruppe sind die Differenzanalyseschritte wie folgt: Zuerst wird die ursprüngliche Lesezahl normalisiert, hauptsächlich um die Sequenzierungstiefe zu korrigieren; Die Wahrscheinlichkeit des Hypothesentests (P-Wert) wurde durch statistisches Modell berechnet, eine Mehrfachhypothesentestkorrektur (BH) durchgeführt

und der Padj-Wert (Falschentdeckungsrate) wurde erhalten, und die Screening-Kriterien für differentiell exprimierte Gene waren: P-Wert<0,05 und  $|\log_2 \text{foldchange}| > 1$ .

### 3. Ergebnisse und Analyse

3.1 das Datenvolumen der Sequenz zählen nach der Datenqualitätskontrolle, und die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Statistik der Sequenzierungsdaten:

Proben - ID	Gesamte Erfassungen	Gesamte Basenpaare	Q20%	Q30%	GC%
Erkrankung 1	126254750	12606117224	96,68	91,79	54,72
Erkrankung 2	122633762	12244448048	97,15	92,73	56,6
Erkrankung 3	124513336	12428742846	96,93	92,35	59,12
Erkrankung 4	122622528	12240070420	97,2	92,88	57,32
Erkrankung 5	125035546	12485493622	97,37	93,22	54,7
Erkrankung 6	125197508	12500394974	97,48	93,44	56,74
Erkrankung 7	122694026	12252490670	97,36	93,19	57,98
Kontrolle 1	122313926	12213503966	97,43	93,44	57,3
Kontrolle 2	122594238	12238263886	97,24	92,97	54,5
Kontrolle 3	119704840	11953716958	97,27	92,92	54,6
Kontrolle 4	125124122	12491538774	97,35	93,09	54,07
Kontrolle 5	122939716	12270757666	97,48	93,45	59,67

(1) Proben-ID: Probeninformationen; (2) gesamte Lesungen: die Anzahl der ursprünglichen Sequenzdaten zählen; (3) gesamte Basen: Die Anzahl der Rohlesevorgänge wird mit der Länge multipliziert und in G umgerechnet; (4) Q20 und Q30: Berechnung des Prozentsatzes der Basen mit PH-red-Werten größer als 20 bzw. 30 an der Gesamtbasen; (5) GC-Gehalt: die Summe der Anzahl der Basen G und C als Prozentsatz der Gesamtzahl der Basen berechnen.

### 3.2 Differentiell exprimierte Genanalyse

Hochdurchsatz-Sequenzierungsanalysen wurden an allen Proben der Krankheitsgruppe und der gesunden Kontrolle durchgeführt, und im Vergleich zur gesunden Kontrolle gab es 437 Gene mit signifikanten Unterschieden, darunter 233 nach oben angeglichenen Gene und 204 nach unten angeglichenen Gene.

Unter ihnen war die Expression von PVALB und KCNA5 bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie signifikant nach oben korrigiert, und die Expression von SPNS3 bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie war signifikant nach unten korrigiert, wie in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Differentielle Genexpression

ID	Gene	Mittelwert-Basen	Log <sub>2</sub> Faltenwechsel	lfcSE	P-Wert	Auf- oder abwärts
ENSG00000100362	PVALB	28,50085	1,774948173	0,677421	0,008789	aufwärts
ENSG00000182557	SPNS3	578,9981	-1,044221487	0,380681	0,006087	abwärts
ENSG00000130037	KCNA5	25,24168	1,094882369	0,476107	0,021468	aufwärts

## Beispiel 2 Verifikation und diagnostischer Wirksamkeitsnachweis von Differentialgenen

### 1. Daten und Vorverarbeitung

5 Die Genexpressionsdaten des GSE33463-Datensatzes der pulmonaler Hypertonie und ihrer Kontrolle wurden aus der GEO-Datenbank heruntergeladen und durch Annotationsdateien annotiert, und mehrere Sonden sollten auf dasselbe Gen wie ihre Expressionsmenge gemittelt werden, und dann wurde die Genexpressionsmatrixdatei erhalten.

### 2. Differentielle Expressionsanalyse

10 Expressionsanalyse differentieller Gene mit dem Packet „limma“ in der R-Software.

Die Analyseergebnisse zeigten, dass die Expression von PVALB und KCNA5 bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie signifikant nach oben korrigiert wurde und die Expression von SPNS3 bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie signifikant nach unten korrigiert, und ihre Expression wurde in Bild 1-3 gezeigt, wobei \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

### 15 3. Analyse der diagnostischen Leistung

Die R-pack „pROC“ ROC-Kurve wurde verwendet, um den AUC-Wert, die Sensitivität und die Spezifität der differentiell exprimierten Gene als Nachweisvariablen zu analysieren, um ihre diagnostische Wirksamkeit zu beurteilen. Bei der Auswertung der diagnostischen Wirksamkeit jedes Gens wird die Expression des Gens direkt für die Analyse verwendet. zuerst das pROC-Packet abrufen, dann die Expressionsmatrix der Zielgenkonstruktion einlesen und den Befehl ausführen, um die ROC-Kurve zu zeichnen, und unter Einbeziehung von AUC, „thres“ (Schwellenwert), „glatt“ (Kurve) Befehl. Bei der Beurteilung der diagnostischen Wirksamkeit von Genkombinationen ist zunächst „glmnet“ zur logistischen Regression von Genen zu verwenden, das aufgestellte logistische Regressionsmodell wird dabei helfen, die „Predict“ Funktion (prognostizierte Funktion) zu bestimmen, und „auum“ den Einfluss einer Prädiktorvariablen auf die Ergebniswahrscheinlichkeit auf verschiedenen Ebenen zu beobachten, die prognostizierte Wahrscheinlichkeit zu berechnen und die ROC-Kurve des prognostizierten Ergebnisses zu zeichnen.

30 Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und Figures 4 - 10 dargestellt, aus denen ersichtlich ist, dass KCNA5, SPNS3, PVALB und ihre Kombinationen bei der Diagnose der pulmonalen Hypertonie eine hohe Genauigkeit aufweisen, insbesondere die Kombination der drei, mit hoher Genauigkeit, Sensitivität und Spezifität.

Tabelle 3: Diagnostische Wirksamkeitsanalyse der differentiell exprimierten Gene

Gene	AUC	Spezifität	Sensitivität
KCNA5	0,662	0,854	0,467
SPNS3	0,659	0,610	0,700
PVALB	0,703	0,756	0,600
KCNA5+SPNS3	0,804	0,585	1,000
KCNA5+PVALB	0,770	0,659	0,800
SPNS3+PVALB	0,807	0,878	0,733
KCNA5+SPNS3+ PVALB	0,901	0,805	0,867

## ANSPRÜCHE

- 5 1. Anwendung von Reagenzien zum Nachweis von Biomarkern in Proben zur Herstellung von Produkten zur Diagnose der pulmonalen Hypertonie, dadurch gekennzeichnet, dass die Reagenzien Biomarker SPNS3 und PVALB umfassen.
- 10 2. Anwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reagenzien ferner Biomarker KCNA5 umfassen.
- 15 3. Anwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Reagenzien Reagenzien zur Bestimmung der Biomarkerspiegel durch Sequenzierungsverfahren, Verfahren der Nukleinsäurehybridisierung, Amplifikationsverfahren der Nukleinsäuren und Proteinimmunoassay-Verfahren umfassen.
- 20 4. Anwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Reagenzien Sonden zur spezifischen Identifizierung der Biomarkern; zur spezifischen Amplifikation von Initiatoren für Biomarker; oder Antikörper der Biomarkern aus spezifischer Kombination umfassen.
- 25 5. Anwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Proben aus Geweben und Blut entnommen sind.
- 30 6. Anwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung von KCNA5, SPNS3 und PVALB-Spiegel in der Probe durch die Bestimmung der Protein- und mRNA-spiegel von KCNA5, SPNS3 und PVALB erfolgt.
- 35 7. Anwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Proteinspiegel von KCNA5, SPNS3 und PVALB in der Probe durch Immunfärbung, Immunfluoreszenz, Western-Blotting und ELISA-Verfahren erfolgt.
8. Anwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des mRNA-Spiegels von KCNA5, SPNS3, PVALB in der Probe durch Microarray, RNA-seq, In situ-Hybridisierung, RNA-scope und reguläre halbquantitativen oder quantitativen RT-PCR Test erfolgt.
9. Anwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Produkt ein Reagenz zur Handhabung der Probe umfasst.

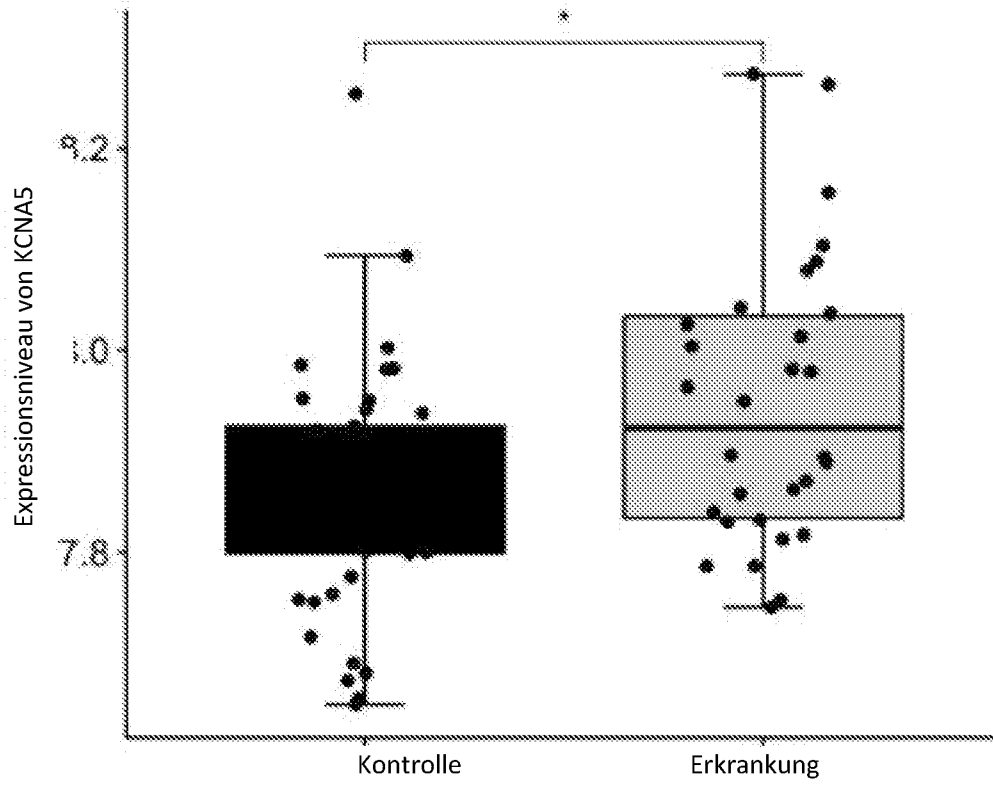


Fig. 1

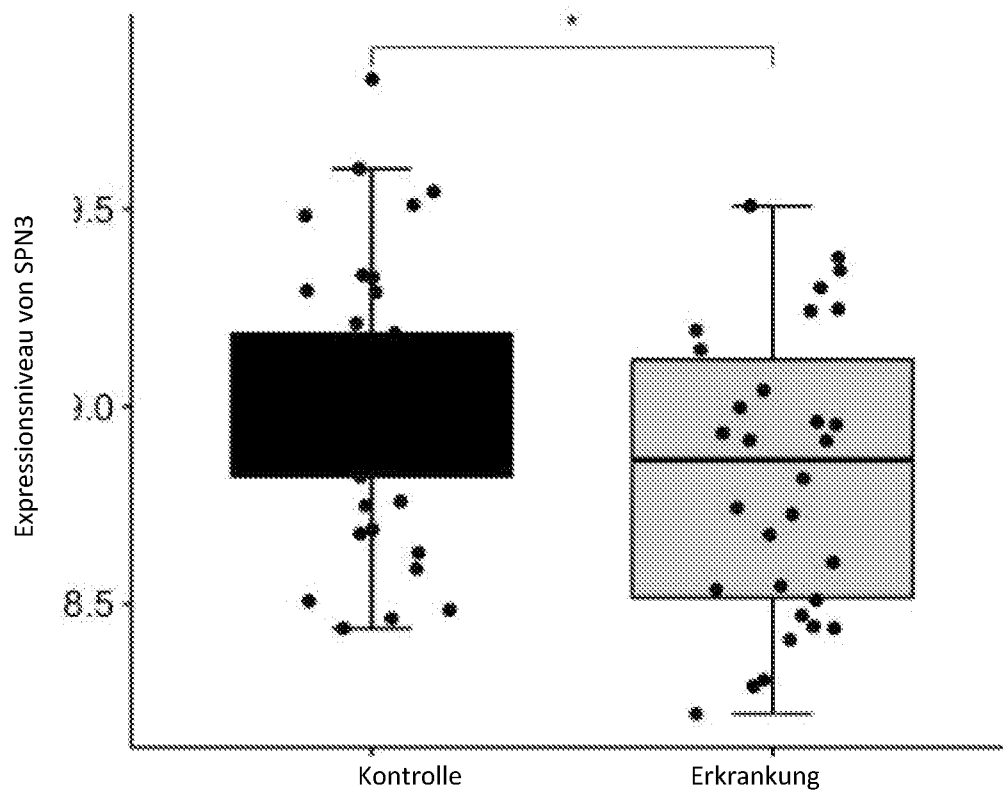


Fig. 2

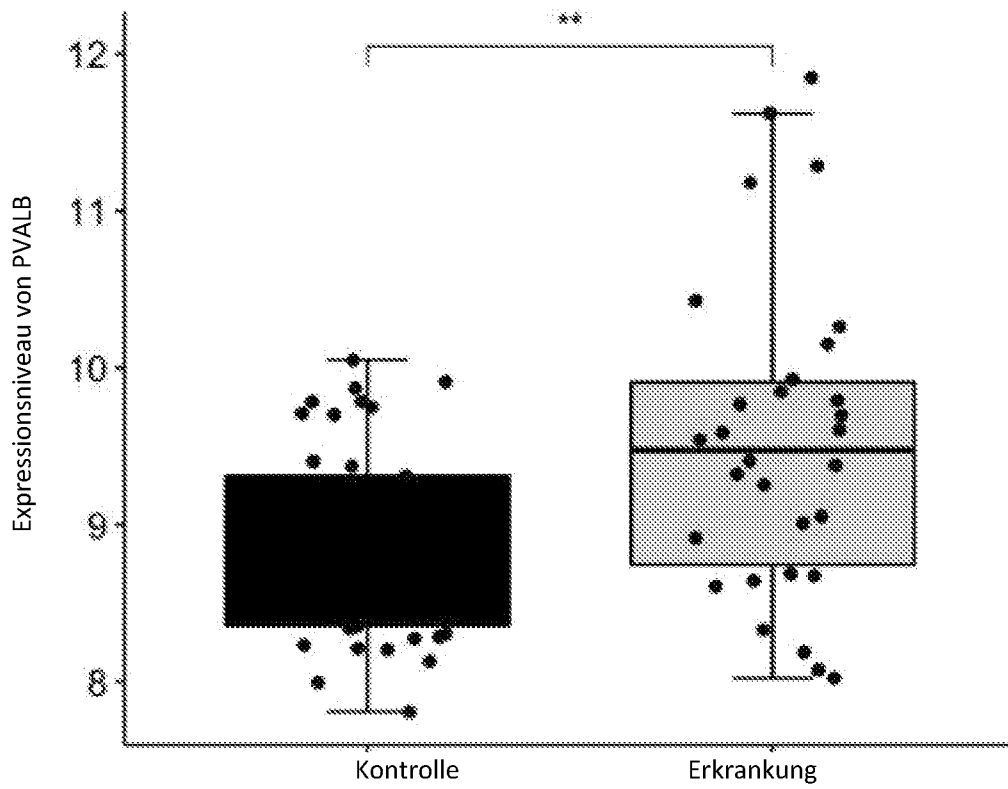


Fig. 3

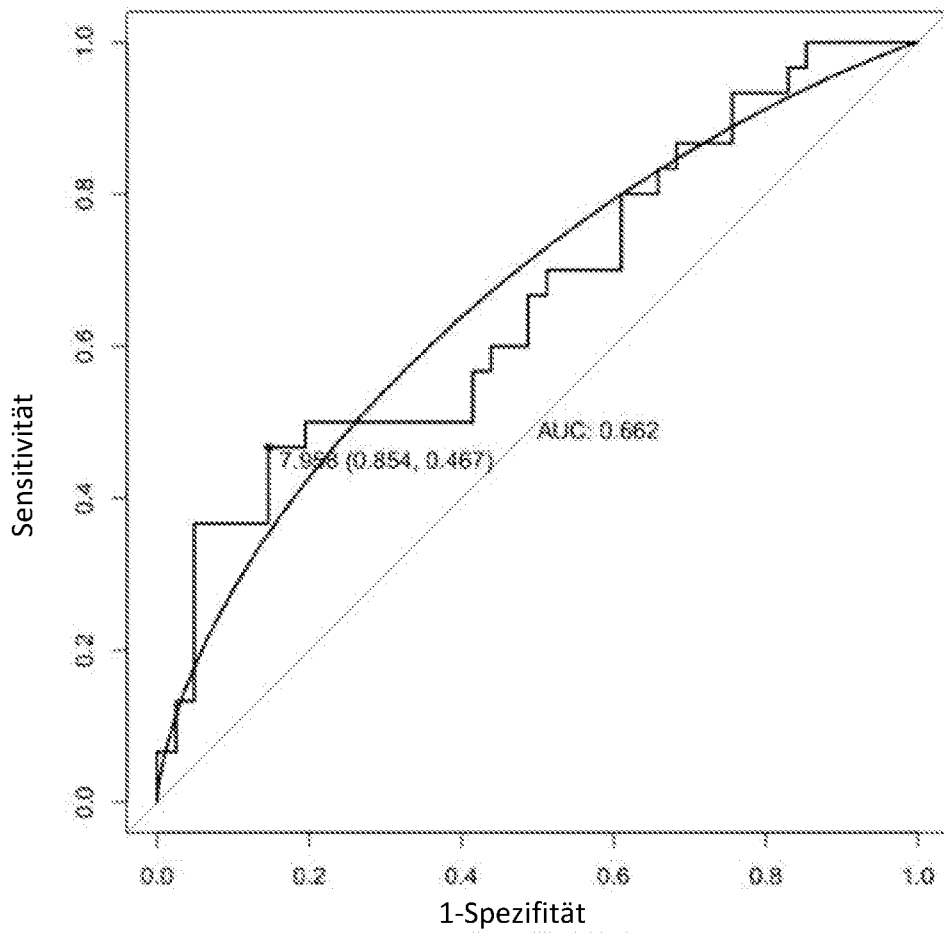


Fig. 4

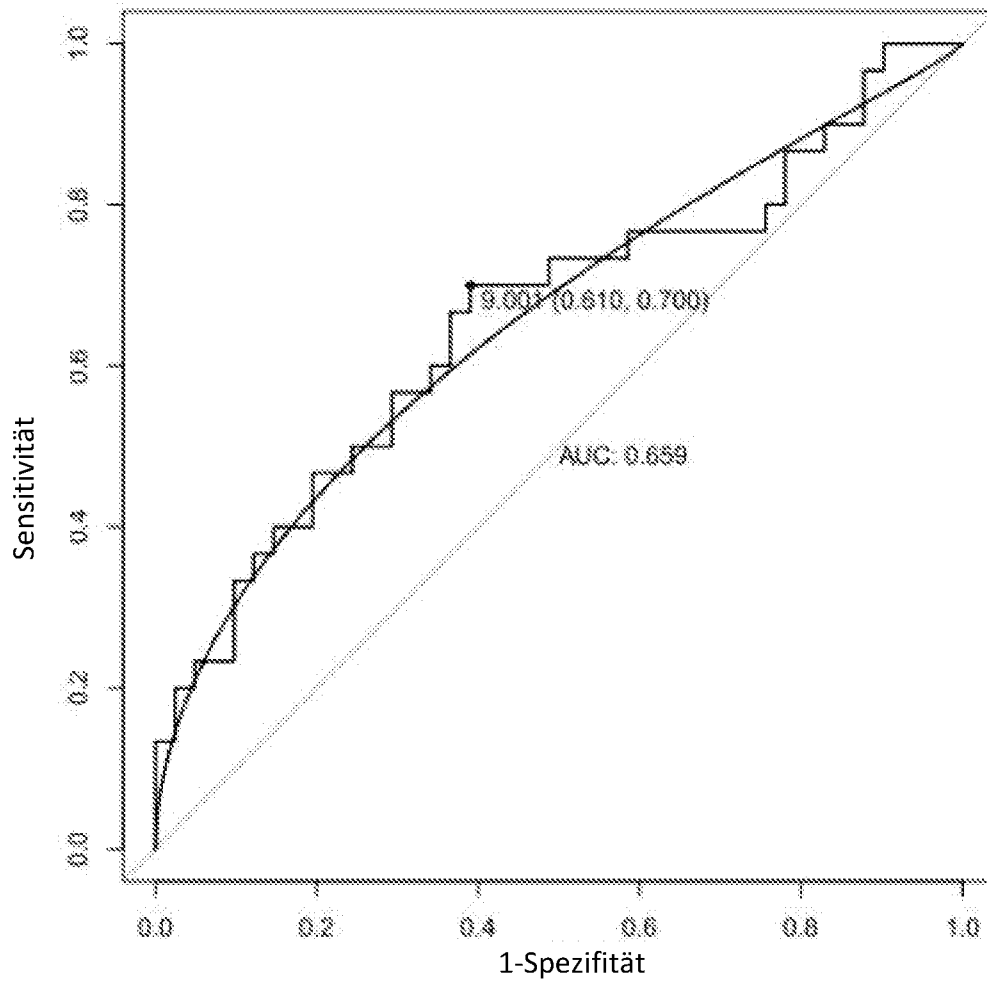


Fig. 5

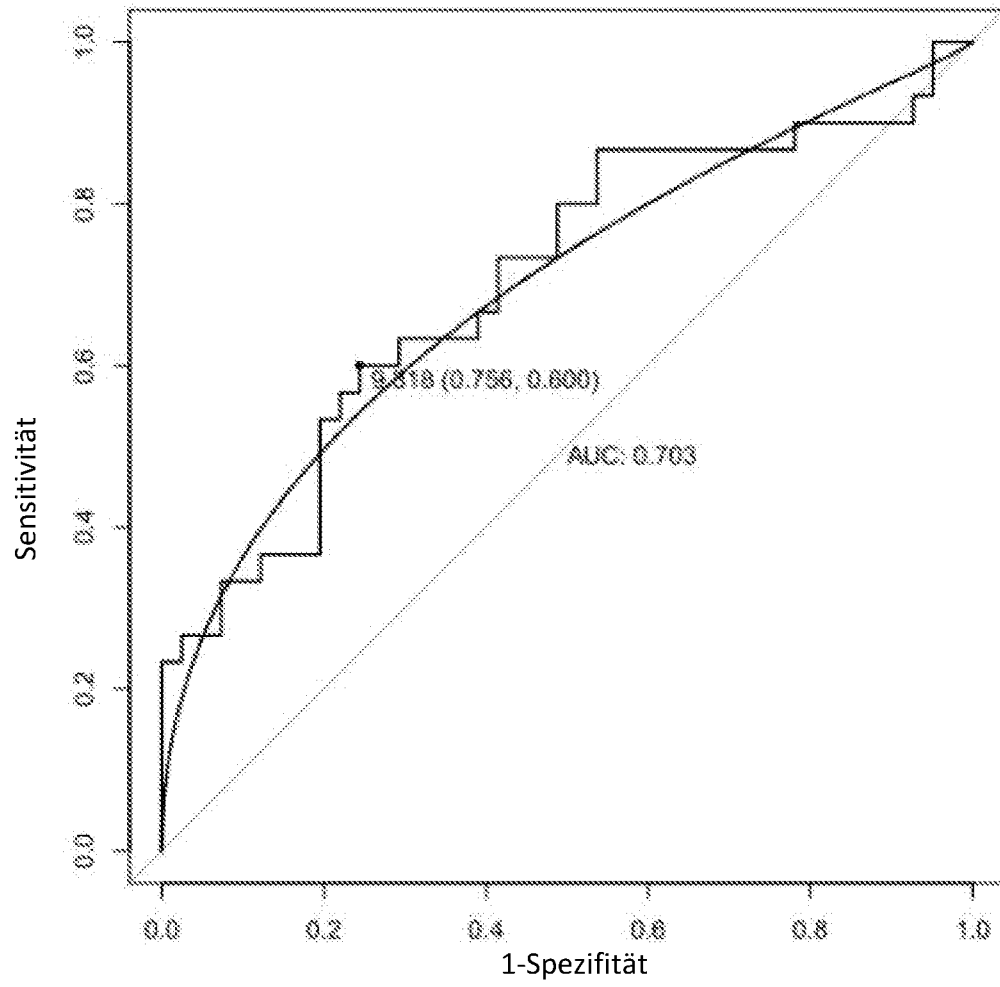


Fig. 6

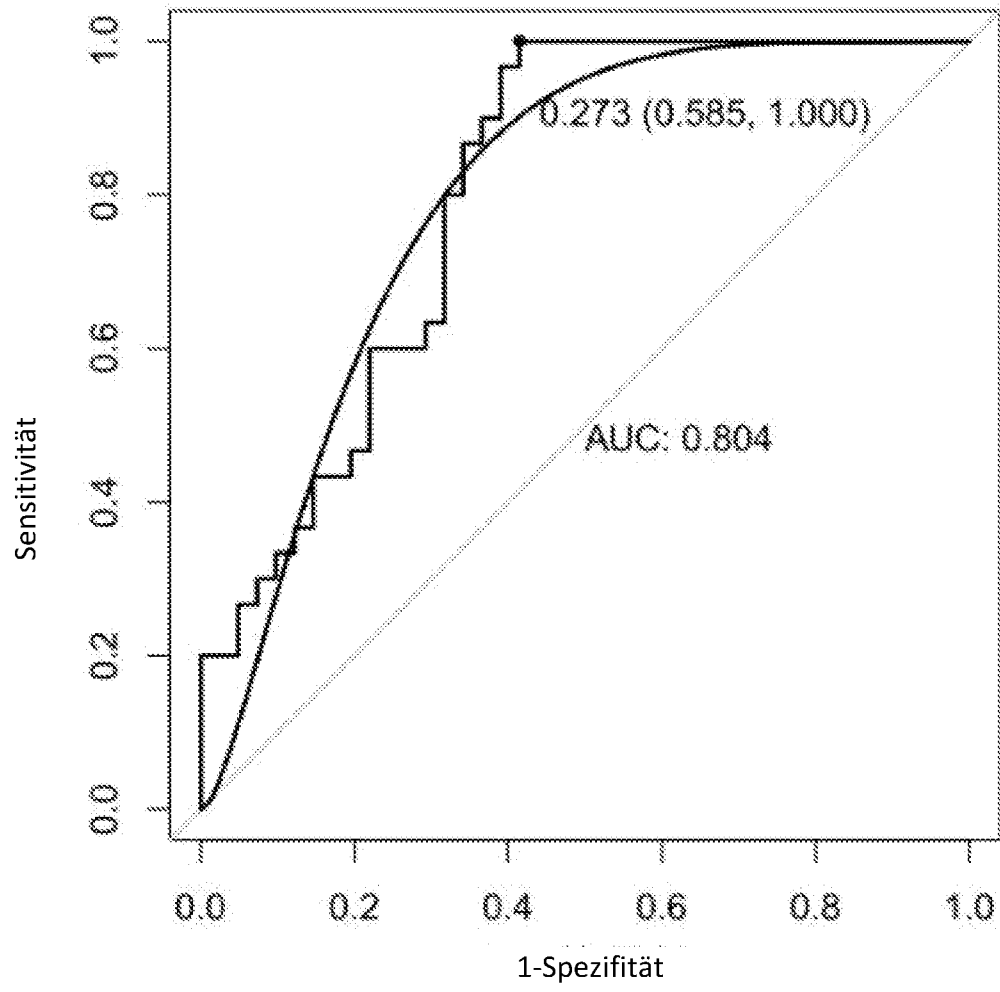


Fig. 7

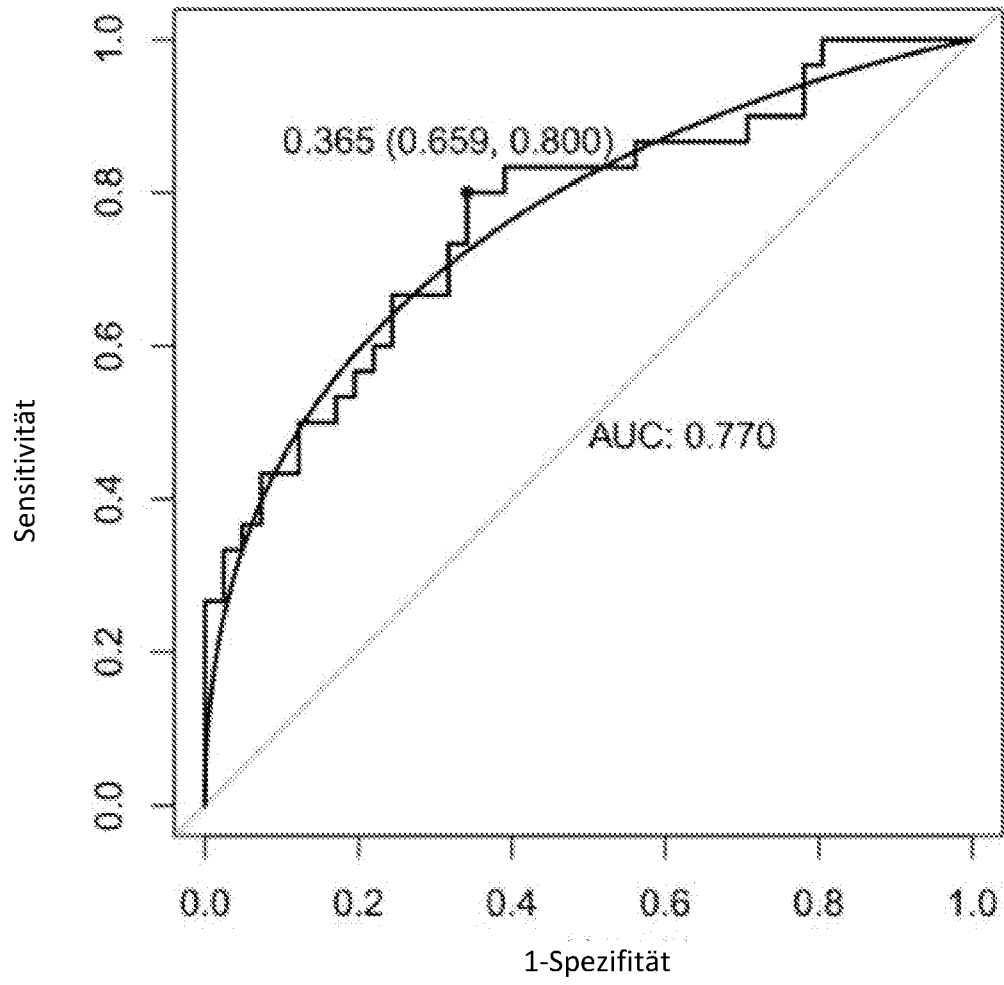


Fig. 8

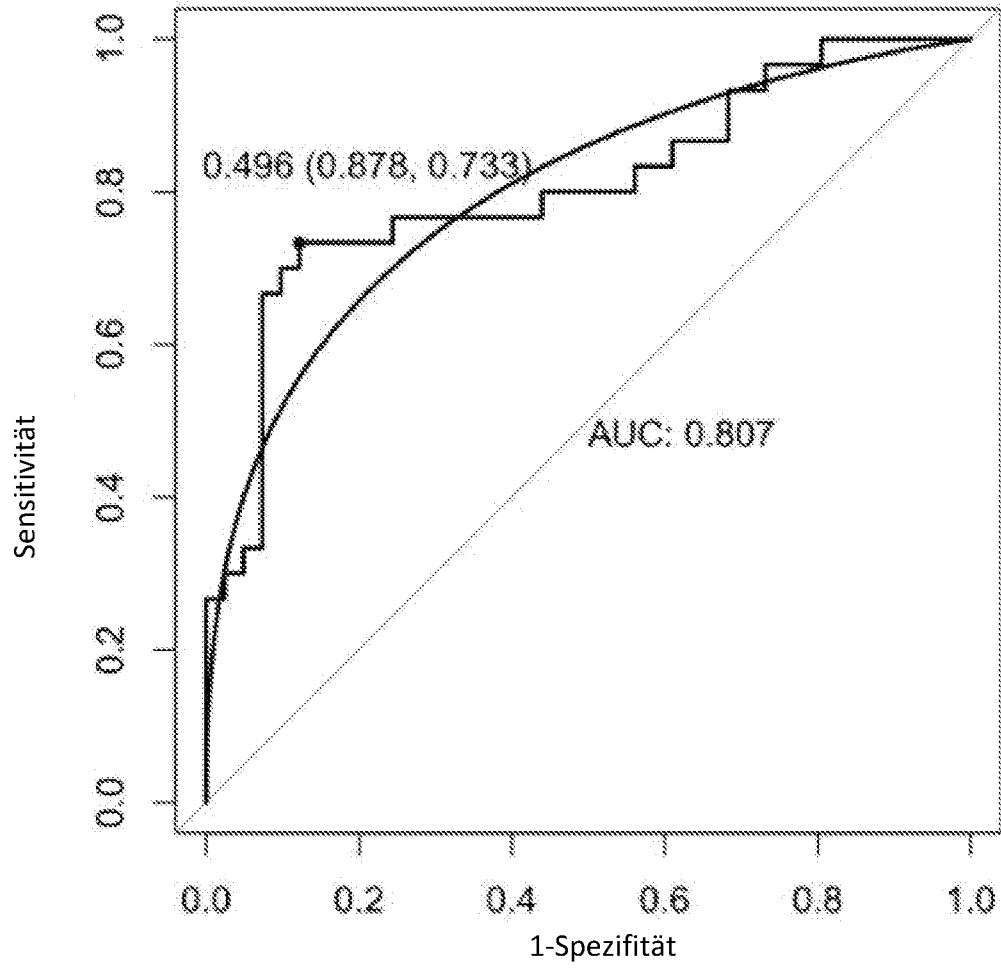


Fig. 9

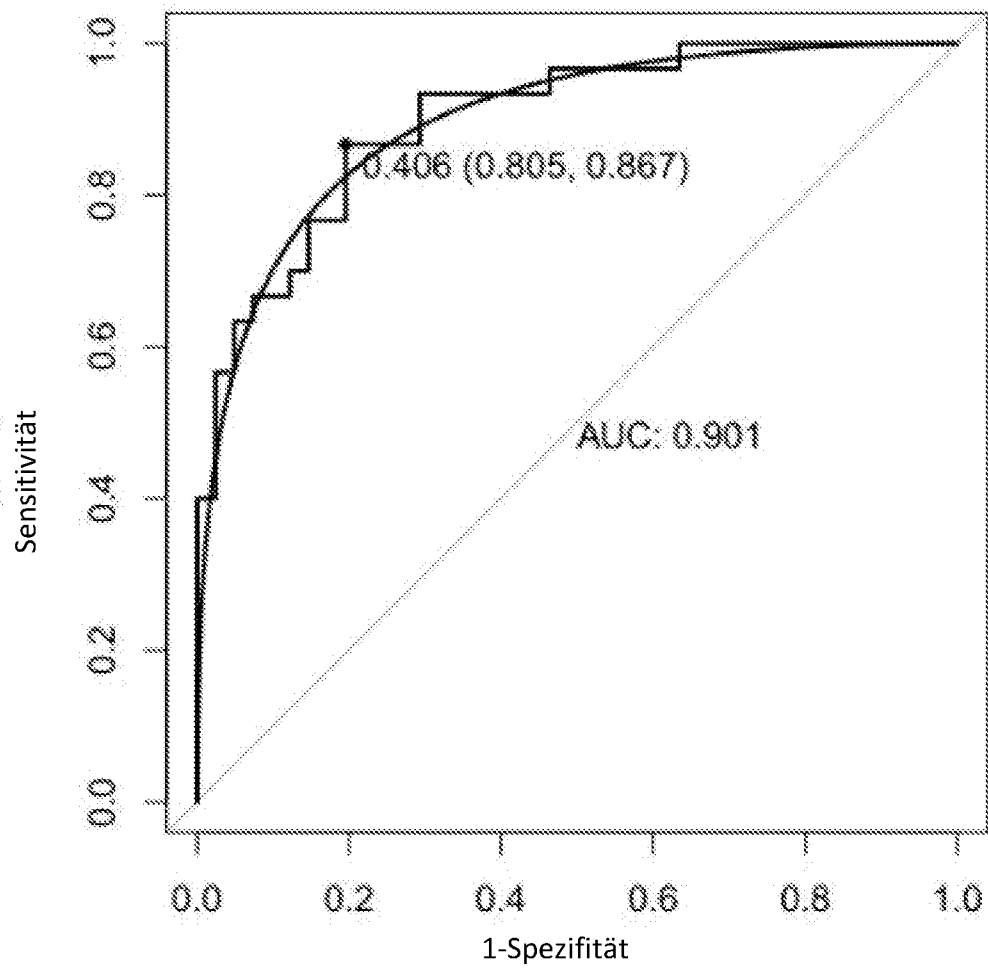


Fig. 10

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**RECHERCHENBERICHT INTERNATIONALER ART NACH ARTIKEL XI.23.,**

**§10 DES BELGISCHEN WIRTSCHAFTSGESETZBUCHES**

<b>KENNZEICHNUNG DER NATIONALEN ANMELDUNG</b>	<b>AKTENZEICHEN DES ANMELDERS ODER ANWALTS</b>
	<b>HEF-HYPERTONIE1 BE</b>
Nationales Aktenzeichen	Anmeldedatum
<b>202305240</b>	<b>30-03-2023</b>
Anmeldeland	Beanspruchtes Prioritätsdatum
Anmelder (Name)	
<b>CHINA-JAPAN FRIENDSHIP HOSPITAL (INSTITUTE OF CLINICAL MEDICINE)</b>	
Datum des Antrags auf eine Recherche Internationaler Art	Nummer, die die internationale Recherchenbehörde dem Antrag auf eine Recherche internationaler Art zugeteilt hat
<b>08-04-2023</b>	<b>SN83624</b>
<b>I. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (treffen mehrere Klassifikationssymbole zu, so sind alle anzugeben)	
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder sowohl nach der nationalen Klassifikation als auch nach der IPC	
<b>Siehe Recherchenbericht</b>	
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>	
Recherchierter Mindestprüfstoff	
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
<b>IPC</b>	<b>Siehe Recherchenbericht</b>
Recherchierte, nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen	
<b>III.</b> <input type="checkbox"/> <b>EINIGE ANSPRÜCHE HABEN SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIESEN</b> (Bemerkungen auf Ergänzungsbogen)	
<b>IV.</b> <input type="checkbox"/> <b>MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG</b> (Bemerkungen auf Ergänzungsbogen)	

**BERICHT ÜBER DIE RECHERCHE INTERNATIONALER ART**

Nr. des Antrags auf Recherche

**BE 202305240**

<p>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  <b>INV. C12Q1/6883</b>  <b>ADD.</b></p>		
<p>Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK</p>		
<p>B. RECHERCHIERTER SACHGEBIETE</p>		
<p>Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  <b>C12Q</b></p>		
<p>Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen</p>		
<p>Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)  <b>EPO-Internal</b></p>		
<p>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE VERÖFFENTLICHUNGEN</p>		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
<b>X</b>	<b>CN 113 502 326 A (CHINA JAPAN FRIENDSHIP HOSPITAL CHINA JAPAN FRIENDSHIP INST OF CLINICA) 15. Oktober 2021 (2021-10-15)</b> <b>* das ganze Dokument *</b> -----	<b>1-9</b>
<b>A</b>	<b>CN 113 493 829 B (CHINA JAPAN FRIENDSHIP HOSPITAL CHINA JAPAN FRIENDSHIP INST OF CLINICA) 12. November 2021 (2021-11-12)</b> <b>* das ganze Dokument *</b> -----	<b>1-9</b>
	-/--	
<p><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</p>		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</p>		
<p>° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll, oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>		
<p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung;; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung;; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
<p>Datum des tatsächlichen Abschlusses der Recherche internationaler Art</p> <p align="center"><b>23. Juni 2023</b></p>		<p>Absenddatum des Berichts über die Recherche internationaler Art</p>
<p>Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde                  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2                  NL - 2280 HV Rijswijk                  Tel. (+31-70) 340-2040,                  Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Bevollmächtigter Bediensteter</p> <p align="center"><b>Ulbrecht, Matthias</b></p>

C.(Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE VERÖFFENTLICHUNGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WANG FENG ET AL: "Identification of a Novel Gene Correlated With Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation and Migration in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension", FRONTIERS IN PHYSIOLOGY, Bd. 12, 11. November 2021 (2021-11-11), XP093056967, DOI: 10.3389/fphys.2021.744219 * das ganze Dokument *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-9
A	<p>Xu W. et al.: "The alterations in molecular markers and signaling pathways in chronic thromboembolic pulmonary hypertension, a study with transcriptome sequencing and bioinformatic analysis", Frontier in Cardiovascular Medicine , 26. Juli 2022 (2022-07-26), XP093056986, Gefunden im Internet: URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9362860/pdf/fcvm-09-961305.pdf">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9362860/pdf/fcvm-09-961305.pdf</a> [gefunden am 2023-06-22] * das ganze Dokument *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-9

**BERICHT ÜBER DIE RECHERCHE INTERNATIONALER ART**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Nr. des Antrags auf Recherche

**BE 202305240**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
<b>CN 113502326</b>	<b>A</b>	<b>15-10-2021</b>	<b>KEINE</b>
-----			
<b>CN 113493829</b>	<b>B</b>	<b>12-11-2021</b>	<b>KEINE</b>
-----			



## SCHRIFTLICHER BESCHEID

Dossier Nr. SN83624	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 30.03.2023	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldung Nr. BE202305240
Internationale Patentklassifikation (IPK) INV. C12Q1/6883			
Anmelder CHINA-JAPAN FRIENDSHIP HOSPITAL (INSTITUTE OF CLINICAL MEDICINE)			

Dieser Bescheid enthält Angaben und entsprechende Seiten zu folgenden Punkten:

- Feld Nr. I Grundlage des Bescheids
- Feld Nr. II Priorität
- Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- Feld Nr. V Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- Feld Nr. VII Bestimmte Mängel der Anmeldung
- Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur Anmeldung

Formblatt BE237A (Deckblatt) (Juli 2022)	Prüfer Ulbrecht, Matthias
--	------------------------------

## SCHRIFTLICHER BESCHEID

---

### Feld Nr. I Grundlage des Bescheids

---

1. Dieser Bescheid wurde auf der Grundlage des vor dem Beginn der Recherche eingereichten Satzes von Ansprüchen erstellt.
2. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der Anmeldung offenbart wurde, ist dieser Bescheid auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls erstellt worden, das
  - a.  im Anmeldezeitpunkt Bestandteil der Anmeldung war.
  - b.  nach dem Anmeldedatum für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde
    - begleitet von einer Erklärung, wonach das Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht.
3.  Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der Anmeldung offenbart wurde, ist dieser Bescheid insoweit erstellt worden, dass ein sinnvolles Gutachten ohne ein dem WIPO-Standard ST.26 entsprechendes Sequenzprotokoll erstellt werden konnte.
4. Zusätzliche Bemerkungen:

---

### Feld Nr. V Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

---

1. Feststellung

Neuheit	Ja: Ansprüche
	Nein: Ansprüche 1-9
Erfinderische Tätigkeit	Ja: Ansprüche
	Nein: Ansprüche 1-9
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ja: Ansprüche: 1-9
	Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

**siehe Beiblatt**

---

### Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur Anmeldung

---

**siehe Beiblatt**

**Re item V**

1 *Zitierte Dokumente*

D1 CN 113 502 326 A (CHINA JAPAN FRIENDSHIP HOSPITAL  
CHINA JAPAN FRIENDSHIP INST OF CLINICA) 15. Oktober 2021  
(2021-10-15)

2 *Neuheit*

2.1 D1 offenbart ein Verfahren zur Diagnose chronischer thromboembolischer pulmonaler Hypertension durch Bestimmung einer Überexpression von KCNA5, SPNS3 und PVALB. Dieses Verfahren ist eine der Alternativen des Anspruchs 1 von D1. Die Tatsache, dass dies Alternative die Biomarker KCNA5, SPNS3 und PVALB umfasst stellt angesichts der offenen "umfasst"-Anspruchsformulierung des Anspruchs 1 keinen Unterschied zum gegenwärtigen Anspruch 1 her. Dies ergibt sich schon aus der Tatsache, dass der abhängige Anspruch 2 KCNA5 als weiteren Marker definiert.

2.2 Die zusätzlichen Merkmale der Ansprüche 2-9 sind ebenfalls in D1 offenbart (siehe z.B. Ansprüche 2-10).

3 *Erfinderische Tätigkeit*

Da keiner der Ansprüche 1-9 neu ist, sind sie ebenfalls nicht erfinderisch.

4 *Industrielle Anwendbarkeit*

Die industrielle Anwendbarkeit der Gegenstände der Ansprüche 1-9 wird anerkannt.

**Re item VIII**

1 Anspruch 1 definiert die Reagenzien als Biomarker SPNS3 und PVALB. Diese Definition ist unklar, da ein Biomarker kein Produkt definiert sondern die Verwendung eines Gens oder Proteins.

2 Diese Unklarheit wird vergrößert durch die Tatsache, dass die Ansprüche 3 und 4 diese Reagenzien so definieren, dass sie nicht mehr die Biomarker selbst sind sondern Reagenzien zu deren Bestimmung.

- 3      Anspruch 9 bezieht sich auf ein Reagenz zur Handhabung einer Probe. Diese Definition ist vage und lässt den Fachmann im Unklaren, welche Produkte umfasst sein sollen, wodurch der Schutzzumfang dieses Anspruchs unbestimmbar wird.