

(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
02. Januar 2025 (02.01.2025)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2025/003527 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/6883 (2018.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2024/068519

(22) Internationales Anmeldedatum:
01. Juli 2024 (01.07.2024)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
23182935.9 30. Juni 2023 (30.06.2023) EP

(71) Anmelder: CERASCREEN GMBH [DE/DE]; Güter-
bahnhofstr. 16, 19059 Schwerin (DE).

(72) Erfinder: BLUM, Wilfried; Lüneburg (DE).

(74) Anwalt: SIMANDI, Claus; Kurfürstendamm 45, 10719
Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

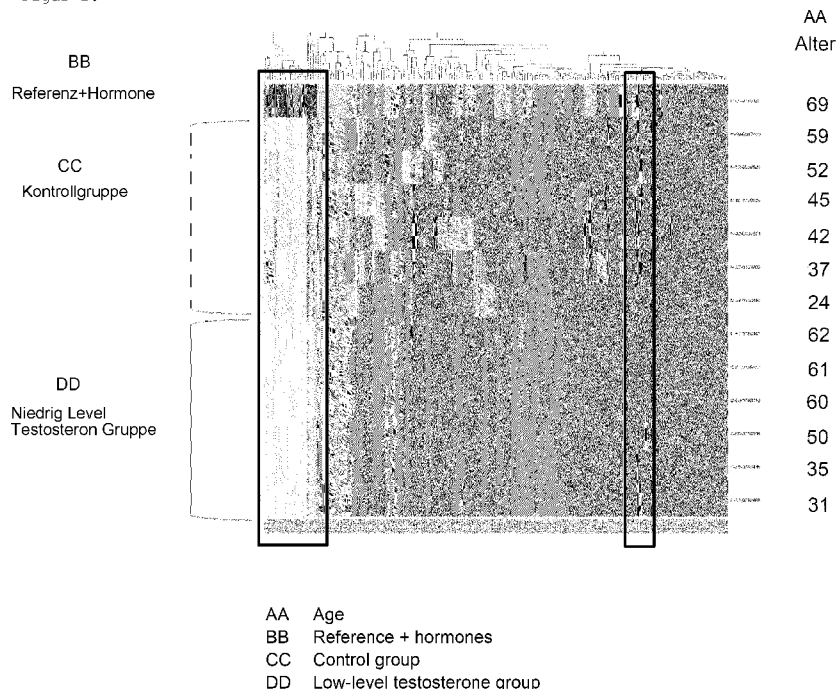
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO,
JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD,
SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY,
KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: MARKER SEQUENCES FOR DIAGNOSING, AND FOR CONTROLLING THE THERAPY OF PATIENTS WITH
TESOSTERONE DEFICIENCY

(54) Bezeichnung: MARKERSEQUENZEN ZUR DIAGNOSE UND THERAPIESTEuerung VON PATIENTEN MIT
TESTOSTERON-DEFIZIENZ

Figur 2:



(57) Abstract: The present invention relates to a method for the diagnosis, prognosis, risk stratification and therapy control of the lack
in testosterone or testosterone deficiency in patients and patient populations, and to the use of suitable marker sequences and to a test kit.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose, Prognose, Risikostratifizierung und Thera-
piesteuerung von Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit bei Patienten und Patientenpopulationen sowie die Verwendung von ge-
eigneten Markersequenzen und ein Test-Kit.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2025/003527 A1

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)
- in Schwarz-Weiss; die internationale Anmeldung enthielt in ihrer eingereichten Fassung Farbe oder Graustufen und kann von PATENTSCOPE heruntergeladen werden.

Markersequenzen zur Diagnose und Therapiesteuerung von Patienten mit Testosteron-Defizienz

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose, Prognose, Risikostratifizierung und Therapiesteuerung von Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit bei Patienten und Patientenpopulationen sowie die Verwendung von geeigneten Markersequenzen und ein Test-Kit.

Testosteron (17β -Hydroxyandrost-4-en-3-on) ist ein männliches Sexualhormon bzw. Androgen, das in den Hoden (Gonaden) produziert wird. Es ist bekannt dafür, männliche körperliche Merkmale zu fördern, wie z.B. Muskelmasse und Körperbehaarung, sowie die Libido zu steigern und die Spermienproduktion zu unterstützen.

Ein Testosteronmangel, auch als Hypogonadismus bezeichnet, bezieht sich auf einen Zustand, wenn die Hoden nicht genügend Testosteron produzieren oder wenn der Körper das produzierte Testosteron alters-, verletzungs- oder krankheitsbedingt nicht richtig nutzen kann. Ebenfalls können genetische Ursachen vorliegen.

Ein Testosteronmangel kann viele Auswirkungen auf den Körper haben, einschließlich einer Verringerung der Muskelmasse und -kraft, einer Erhöhung des Körperfetts, einer Abnahme der Knochendichte, einer Reduzierung der Libido und Erektionsstörungen. Es kann auch zu Müdigkeit, Depressionen, Stimmungsschwankungen und einer verringerten geistigen Schärfe führen.

Die Diagnose eines Testosteronmangels wird durch Bluttests zur Messung des Testosteronspiegels im Körper gestellt. Wenn ein Mangel diagnostiziert wird, kann mittels Hormonersatztherapien behandelt werden, wie z.B. der Verabreichung von Testosteroninjektionen, Gelen oder Pflastern.

Die Epigenetik bezieht sich auf Veränderungen in der Genexpression, die nicht auf Änderungen in der DNA-Sequenz selbst zurückzuführen sind. Stattdessen regulieren epigenetische Mechanismen, wie Chromatinstruktur und DNA-Methylierung, welche Gene aktiv oder inaktiv sind und damit welche Proteine produziert werden.

Chromatin ist die Struktur, in der die DNA im Zellkern verpackt ist, und die Methylierung von DNA ist ein Prozess, bei dem Methylgruppen an die DNA gebunden werden, wodurch die Chromatinstruktur verändert wird. Diese epigenetischen Veränderungen können dauerhaft oder vorübergehend sein und durch verschiedene Faktoren wie Alter, Umwelt und Lebensstil beeinflusst werden.

Epigenetische Veränderungen können wichtige Auswirkungen auf die Gesundheit und die Entwicklung haben. Zum Beispiel kann eine Aberration in der Methylierung von bestimmten Genen das Risiko für bestimmte Krankheiten erhöhen oder sogar den Verlauf der Krankheit beeinflussen. Eine Aberration in der Chromatinstruktur kann auch dazu führen, dass bestimmte Gene nicht mehr exprimiert werden, was wiederum zu einer Anomalie in der Entwicklung führen kann.

Die Epigenetik hat auch das Potenzial, zur Entwicklung von Therapien beizutragen, indem sie ermöglicht, bestimmte Gene zu aktivieren oder zu deaktivieren, um bestimmte Erkrankungen zu behandeln. Die Epigenetik wird auch intensiv erforscht, um mehr über die zugrunde liegenden Mechanismen der Genexpression zu erfahren und das Verständnis von Entwicklungsprozessen und Krankheiten zu vertiefen.

CpG-Sites sind DNA-Regionen, die aus einem Cytosin (C) und einem Guanin (G) bestehen, die durch eine Phosphatbindung miteinander verbunden sind. Diese CpG-Dinukleotide sind in der DNA nicht gleichmäßig verteilt, sondern treten in Gruppen auf, die als CpG-Inseln bezeichnet werden.

CpG-Sites spielen eine wichtige Rolle in der Epigenetik, da sie die primäre Zielregion für DNA-Methylierungsreaktionen sind. Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe an das Kohlenstoffatom des Cytosins gebunden, was zur Bildung von 5-Methylcytosin (5mC) führt. Die Methylierung von CpG-Sites kann dazu führen, dass die Genexpression in der umliegenden DNA-Region unterdrückt wird, was zu einer Verminderung oder gar Abschaltung der Genexpression führt.

Tatsächlich werden CpG-Inseln häufig in Promotor-Regionen von Genen gefunden, die mit der Regulation der Genexpression verbunden sind. Eine Aberration in der Methylierung von CpG-Inseln kann die Expression von Genen beeinflussen und zu verschiedenen Krankheiten oder Zuständen beitragen, wobei eine Methylierung oder Demethylierung der CpG-Sites bzw. CpG-Inseln erfolgt. Die häufigste Form ist die sogenannte Hypermethylierung der CpG-Sites bzw. CpG-Inseln. Weiterhin ist die Hypomethylierung beschrieben.

Die Identifizierung von CpG-Sites bzw. CpG-Inseln hat folglich eine wichtige Bedeutung in der Epigenetik-Forschung, insbesondere in der Identifikation von epigenetischen Markern und deren Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten.

Überraschenderweise konnten die Erfinder epigenetische Marker für den Zustand des Testosteronmangels bei einem Patienten identifizieren, insbesondere in Abhängigkeit des Alterns.

Daher ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung die Therapie, Prophylaxe und Verhinderung des Testosteronmangels mittels medikamentöser Behandlung als auch hinsichtlich klinischer Entscheidungen zu verbessern.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist ebenfalls die Therapiesteuerung mittels einer Prognose oder Diagnose von Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit - Patienten. Insbesondere solche Testosterondefizit - Patienten, die bisher keine medikamentöse Behandlung erfahren bzw. vorzugsweise zur

Früherkennung solcher Testosterondefizit - Patienten, insbesondere zur Prophylaxe oder Verhinderung eines Testosteronmangels bzw. Testosterondefizits.

Diese Aufgaben werden durch die technische Lehre der Patentansprüche gelöst.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass ein Verfahren zur Diagnose oder Prognose von Patienten mit Testosteronmangel bereitgestellt wird, umfassend Analyse des Methylierungsstatus von mindestens einer CpG-Insel einer Markersequenz (MS) ausgewählt aus MS No. 1 - 23 einer Patientenprobe, wobei mindestens eine Modifikation durch Methylierung und / oder Demethylierung im Vergleich mit der jeweiligen MS No. 1 - 23 indikativ ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Diagnose oder Prognose von Patienten mit Testosteronmangel, umfassend Analyse des Methylierungsstatus von mindestens einer CpG-Insel einer Markersequenz ausgewählt aus MS No. 1 - 23, wobei eine Hypermethylierung oder Hypomethylierung der jeweiligen MS No. 1 - 23 vorliegt und indikativ ist.

Aus den Ergebnissen der Beispiele zeigt sich die Eignung der erfindungsgemäßen Markersequenzen besonders geeignet für Patienten im Alter von 25 - 60 Jahren, insbesondere 30 - 55 Jahren, siehe Figuren 1 und 2.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung daher ein Verfahren zur Diagnose oder Prognose von Patienten mit Testosteronmangel, wobei die Patienten ausgewählt sind aus der Gruppe 30 - 55 Jahre.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von einer oder mehreren erfindungsgemäßen Markersequenz(en) zur Stratifizierung und Therapiesteuerung von Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit - Patienten.

Eine weitere Ausführungsform betrifft die erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet, dass 2 oder 3, vorzugsweise 4 oder 5, besonders bevorzugt 6, 7 oder 8 oder mehr verschiedene Markersequenzen, beispielsweise 10 bis 20 verschiedene Markersequenzen verwendet werden. Ein solches Set an Markersequenzen wird Panel genannt.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zum Stratifizieren, insbesondere zur Risikostratifizierung, oder zur Therapiesteuerung eines Patienten von Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit - Patienten, wobei mindestens eine erfindungsgemäße Markersequenz verwendet wird, um eine Probe des Patienten zu untersuchen.

Ganz besonders geeignet ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Frühdiagnose oder Früherkennung von Testosteronmangel, wobei insbesondere keine, also asymptomatisch, oder wenig Symptome (supra) am Patienten zu erkennen sind.

Eine Ausführungsform betrifft ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Diagnose von Testosteronmangel, wobei das Stratifizieren oder die Therapiesteuerung Entscheidungen zur Behandlung und Therapie des Patienten, insbesondere Einsatz, Wirkung und / oder Dosierung eines oder mehrerer Arzneimittel, insbesondere Testosteron oder ein Testosteronderivat, eine therapeutische Maßnahme oder die Überwachung eines Krankheitsverlaufes sowie Therapieverlaufs, Ätiologie oder Klassifizierung einer Erkrankung, ggfs. samt Prognose umfasst.

Daher betrifft die Erfindung die Verwendung von Markersequenzen zur Stratifizierung oder Therapiesteuerung von Testosteronmangel, wobei mindestens eine Markersequenz ausgewählt aus der Gruppe der Markersequenzen MS No 1-23 Teilsequenzen oder Fragmente davon, Homologen der Sequenzen MS No. 1-23 mit mindestens 90 % Homologie zu einem zu untersuchenden Patienten bestimmt wird, wobei mindestens eine

Modifikation durch Methylierung und / oder Demethylierung im Vergleich mit der jeweiligen MS No. 1 - 23 indikativ ist.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Markersequenz(en) zur Stratifizierung oder Therapiesteuerung von Testosteronmangel, wobei die Bestimmung mittels einer in-vitro Diagnose erfolgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bestimmung der Markersequenzen außerhalb des menschlichen Körpers und die Bestimmung erfolgt in einer ex vivo / in vitro Diagnose.

Die erfindungsgemäßen Markersequenzen konnten mittels differentiellen Screenings von Proben von gesunden Probanden mit Patientenproben mit Testosteronmangel identifiziert werden, siehe Beispiele.

Vorzugsweise erfolgt die Analyse mittels Amplifikation durch ein Polymerase-Enzym, eine PCR oder eine chemische Amplifikationsreaktion oder andere Amplifikationsverfahren, d.h. im Rahmen von MSP, HeavyMethyl, Scorpion, MS-SNUPE, MethylLight, Bisulfit-Sequenzierung, methylspezifische Restriktionsassays und/oder digitale PCR (siehe, zum Beispiel Kristensen und Hansen PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment Clinical Chemistry 55:8 1471-1483 (2009)).

Um die Bisulfit-Konvertibilität der CpG-Inseln zu analysieren, kann jedes bekannte Verfahren zur Analyse der DNA-Methylierung verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst die Analyse des Methylierungsstatus ein Verfahren ausgewählt aus Methylierungs-spezifischem enzymatischem Verdau, Bisulfit-Sequenzierung, einer Analyse ausgewählt aus Promotermethylierung, CpG-Insel-Methylierung, MSP,

HeavyMethyl, MethyLight, Ms-SNuPE oder anderen Methoden, die auf dem Nachweis amplifizierter DNA beruhen. Diese Verfahren sind dem Fachmann gut bekannt und finden sich in der entsprechenden Literatur.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Verfahren für Routineanwendungen, beispielsweise auf einem DNA-Array geeignet. Basierend auf den obigen Informationen und der entsprechenden Literatur kann der Fachmann das obere Verfahren wie oben beschrieben an diese Einstellungen anpassen.

Der Begriff „Testosteronmangel“ ist erfindungsgemäß definiert, dass der Patient weniger als 30 pg/ ml oder 40 pg/ ml freies Testosteron im Speichel in der Altersgruppe 30 -65 Jahren aufweist. Die Diagnose und Prognose ist auch dahingehend zu verstehen, dass der Proband in Zukunft von einem Testosteronmangel betroffen sein kann, auch wenn er zum Zeitpunkt der Probenentnahme normale Testosteronwerte aufweist, nämlich 30-140 pg/ ml freies Testosteron im Speichel.

„Diagnose“ oder „Prognose“ im Sinne dieser Erfindung bedeutet die positive Feststellung oder Vorhersage bzw. Wahrscheinlichkeit des Eintretens von Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit mittels der erfindungsgemäßen Markersequenzen sowie die Zuordnung der Patienten zur Indikation Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit. Der Begriff der Diagnose umfasst die medizinische Diagnostik und diesbezügliche Untersuchungen, insbesondere die in-vitro Diagnostik und Labordiagnostik.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Stratifizieren, insbesondere zur Risikostratifizierung und / oder Therapiesteuerung eines Patienten mit Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit, beispielsweise bei einem Patienten

mit einem sehr frühen Stadium von Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit.

„Stratifizieren oder Therapiesteuerung“ im Sinne dieser Erfindung bedeutet, dass das erfindungsgemäße Verfahren Entscheidungen zur Behandlung und Therapie des Patienten erlaubt, sei es Hospitalisierung des Patienten, Einsatz, Wirkung und / oder Dosierung eines oder mehrerer Arzneimittel, eine therapeutische Maßnahme oder die Überwachung eines Krankheitsverlaufes sowie des Therapieverlaufs bzw. Ätiologie oder Klassifizierung von Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfasst der Begriff „Stratifizierung“ insbesondere die Risikostratifizierung mit der Prognose eines „outcome“ eines nachteiligen gesundheitlichen Ereignisses.

Im Rahmen dieser Erfindung wird unter „Patient“ ein beliebiger Proband – Mensch oder Säugetier, vorzugsweise mit männlichem Geschlecht – verstanden, mit der Maßgabe, dass der Proband auf Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit untersucht wird, insbesondere ein Therapieerfolg oder Therapieverbesserung oder mit der Maßgabe, dass der Proband bzw. das Individuum Medikamente zur Behandlung von Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit erhält bzw. erhalten soll, wie beispielsweise mittels einer Hormonersatztherapie.

Die zu untersuchende Sequenzen in einer Probe sind erfindungsgemäß Bestandteil einer Körperflüssigkeit, insbesondere Blut, Vollblut, Blutplasma, Blutserum, Patientenserum, Urin, Cerebrospinalflüssigkeit, Synovialflüssigkeit oder eines Gewebeauszuges des Patienten.

Ganz besonders bevorzugt ist jedoch die Probenentnahme mithilfe eines Wangenabstriches.

Die erfindungsgemäßen Markersequenzen MS No. 1-23 sind Gegenstand der Tabelle 1 und können durch den jeweilig zitierten Datenbankeintrag (Internet: [www.http://www.ewascatalog.org/](http://www.ewascatalog.org/)) eindeutig identifiziert werden (siehe cg und Gennamen samt Position/Loci).

Tabelle 1: Markersequenzen (MS) aus Homo sapiens

MS No	SEQ ID	cg	Name	Gene Type	Gene
<u>1</u>	1	cg15570860	TMEM9B antisense RNA 1	ncRNA	C11orf15 Chr11:8986840
<u>2</u>	2	cg26624794	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment 1	Protein coding	chr5:172332685
<u>3</u>	3	cg01600516	arachidonate 12-lipoxygenase, 12S type	Protein coding	chr17:6904264
<u>4</u>	4	cg04777551	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	Protein coding	chr6:32628954
<u>5</u>	5	cg05162750	T-box transcription factor 2	Protein coding	chr17:59476506
<u>6</u>	6	cg13072209	SLC22A23	Open sea	chr6:3298568
<u>7</u>	7	cg11796481	NUP93	Open sea	chr16:56864618
<u>8</u>	8	cg26495595	TSGA10	Open sea	chr2:99696417
<u>9</u>	9	cg22564046	PFKP	South shore	chr10:3161236
<u>10</u>	10	cg19843426	PARD6G-AS1;PARD6G	Open sea	chr18:77925064
<u>11</u>	11	cg22017303	Gene AGL	Open sea	chr1:100327026
<u>12</u>	12	cg03029993	Gene4 KIAA1429	Open sea	chr8:95538708

13		cg01659459	protein phosphatase 2 regulatory subunit B'gamma	Protein coding	chr14:102227496
14		cg16398051	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 17	Protein coding	chr15:100821467
15		cg24534774	pre-mRNA processing factor 31	Protein coding	chr1:101106534
16		cg24643105	n.a.	n.a.	chr11:113928473
17		cg23476908	p21 (RAC1) activated kinase 3	Protein coding	chrX:110365603
18		cg27590199	sarcoma antigen 1	Protein coding	chrX:134974589
19		cg12342501	n.a.	Open sea	chr2:8530522
20		cg03165426	CRHR2	Open sea	chr7:30726958
21		cg00979438	n.a.	Open sea	chr16:73199845
22		cg04531698	MGST1	Open sea	chr12:16514921
23		cg16191297	Gene TRAPPC9	Open sea	chr8:140926710

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung sind Homologe der erfindungsgemäßen Markersequenzen umfasst. Insbesondere solche Homologen, die eine Identität von 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % oder 95% Identität, insbesondere 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Identität mit den erfindungsgemäßen Markersequenzen aufweisen und für die erfindungsgemäße Verwendung – den Nachweis von Testosteronmangel bzw. Testosterondefizit geeignet sind (sog. „Homologe“, homologe Markersequenzen).

Teilsequenzen oder Fragmente sind solche Sequenzen, die 50 bis 100 Nukleotide, vorzugsweise 100–500, besonders bevorzugt 500

bis 1000 Nukleotide einer der Markersequenzen MS No. 1-23 aufweisen, wie z.B. Oligonukleotide.

Solche Markersequenzen der jeweiligen genomischen DNA zu MS No. 1 - 23 sind in den Sequenzen SEQ ID No. 1-12 ausgewiesen gemäß Tabelle 1 und sind entsprechend zu lesen. Die SEQ ID No. 1-12 sind in den jeweilig zugehörigen MS No. enthalten.

Ein weiterer bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein (Test-)Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, insbesondere basierend auf der Analyse der Bisulfit-Zugänglichkeit von CpG-Inseln der Markersequenzen MS No. 1-23, umfassend Komponenten zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, insbesondere umfassend optional ein Bisulfitreagenz und Materialien zur Analyse des Methylierungsstatus der CpG-Inseln ausgewählt aus mindestens einer Markersequenz, insbesondere ein Oligomer.

Die Erfindung wird nun in den folgenden Beispielen und unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren und das Sequenzprotokoll näher beschrieben, ohne darauf beschränkt zu sein.

Beispiele und Figuren:

Die DNA des Probanden wird mittels Oracollect Probenahmesystem (OraCollect 100 der Firma Genotek) durch einen Abstrich der Epithelzellen der Wangeninnenseite entsprechend den Herstellerangaben genommen.

Die Aufreinigung der DNA zur Analyse erfolgt mittels Qiagen DNA-Aufreinigungs kit (QIAamp UCP DNA Micro Kit) entsprechend der Arbeitsanleitung.

Die epigenetische Analyse erfolgt auf dem Illumina Infinium R MethylationEPIC BeadChip system entsprechend den Herstellerangaben:

Illumina DNA Prep Reference Guide (1000000025416 v10);

<https://support.illumina.com/documentation.html>

Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip, PDF

<https://support.illumina.com/documentation.html>

Noble AJ, Pearson JF, Boden JM, Horwood LJ, Gemmell NJ, Kennedy MA, Osborne AJ. A validation of Illumina EPIC array system with bisulfite-based amplicon sequencing. PeerJ. 2021 Feb 10;9:e10762. doi: 10.7717/peerj.10762. PMID: 33614276; PMCID: PMC7881719.

Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, Gunderson KL. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay. Epigenomics. 2009;1(1):177-200. doi: 10.2217/epi.09.14. -

Data Analysis

Es wurden zunächst die Methylierungen gegen interne Kontrollen abgeglichen (z.B. Standards aus einer epigenetischen Datenbank). In einem zweiten Schritt erfolgte die Differenzierung gegen die Kontrollgruppe der "Testosteron-Supplementierer" (hierbei handelt es sich um Probanden, die seit Jahren Testosteron zuführen müssen).

Die Analyse der resultierenden iDat-Dateien erfolgte in R für die statistische Datenanalyse. Ergebnisdateien im idat Format werden direkt mit R ausgelesen.

P package bereitgestellt vom MIT:

https://web.mit.edu/~r/current/arch/i386_linux26/lib/R/library/limma/html/read.idat.html

Heatmap analyse und Darstellung mit den Package in R

(The R Graph Gallery, <https://r-graph-gallery.com> > heatmap)

Daten werden Chip-weise mit den internen Kontrollen normalisiert.

Hierbei erfolgt der Vergleich der Methylierungsintensität der genannten Markersequenzen nach Verrechnung gegen die internen Standards (Normalisierung).

Aus der Analyse der Heat Map zeigt sich das einzelne Methylierungsstellen deutlich auf den Testosteronmangel indizieren. Eine einzelne Methylierungsstelle kann bereits für eine klinische oder diagnostische oder prognostische Aussage ausreichen.

Die Methylierungsintensitäten wurden gegen zwei unterschiedliche Gruppen kontrolliert.

1. Kontrollgruppe mit normalem Testosteron- Spiegel. Diese Daten unterstützen die Aussage zur Altersabhängigkeit des Testosteronspiegels.

2. Kontrollgruppe mit Testosteron-Supplementierer. Diese indiziert die Marker, die für die prognostische oder diagnostische Aussage notwendig sind.

Um den klassischen altersbedingten Testosteronmangel von denen mit altersunabhängigen Testosteronmangel zu differenzieren, wurde die Analyse vergleichend gegen die Kontrollgruppe ("gesunde Männer unterschiedlichen Alters") durchgeführt.

Figuren 1 und 2 zeigen die Heat map von 184 untersuchten GpC Inseln in Abhängigkeit des Alters und Populationsgruppen (Low Level Testosterongruppe und Kontrollgruppe).

Auswertung:

Der Vergleich erfolgte einerseits gegen die Kontrollgruppe also "gesunde Männer mit klassischem altersgerechten Testosteronspiegel", sowie gegen die Gruppe der Hormon-Supplementierer („Reference + Hormone“).

Identifikation der relevanten CpGs.

Identifiziert wurden die CpGs mit einer gewählten Differenz der relativen Methylierungsintensität größer 1,1 (max . der Skala = 2) zwischen der Gruppe "Testosteronmangel (Low Level Testosterongruppe)" und der Gruppe der "Supplementierer". Die gewählte Differenz kann auch geringer sein.

Außerdem wurde die Abhängigkeit vom Alter geprüft.

Zur statistischen Absicherung wurde für alle relevanten CpG eine Signifikanzprüfung mittels t-Test durchgeführt, wobei jeweils $p < 0,01$ oder kleiner ist.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Diagnose oder Prognose oder Risikostratifizierung von Patienten mit Testosteronmangel, umfassend Analyse des Methylierungsstatus von mindestens einer CpG-Insel einer Markersequenz ausgewählt aus MS No. 1 - 23 einer Patientenprobe, wobei mindestens eine Modifikation durch Methylierung und / oder Demethylierung im Vergleich mit der jeweiligen MS No. 1 - 23 indikativ ist.
2. Verfahren zur Diagnose oder Prognose oder Risikostratifizierung von Patienten mit Testosteronmangel nach Anspruch 1, wobei eine Hypermethylierung oder Hypomethylierung der jeweiligen MS No. 1 - 23 vorliegt.
3. Verfahren zur Diagnose oder Prognose oder Risikostratifizierung von Patienten mit Testosteronmangel nach einem der vorstehenden Patentansprüche, wobei die mindestens eine CpG-Insel einer Markersequenz ausgewählt ist aus MS No. 1-12 mit SEQ ID No. 1-12 und MS 13-23 mit der genannten cg-Nummer oder Genloci gemäß Tabelle 1.
4. Verfahren zur Diagnose oder Prognose oder Risikostratifizierung von Patienten mit Testosteronmangel nach einem der vorstehenden Patentansprüche, wobei die Patienten ausgewählt sind aus der Gruppe 30 - 55 Jahre.
5. Verfahren zur Diagnose oder Prognose oder Risikostratifizierung von Patienten mit Testosteronmangel nach einem der vorstehenden Patentansprüche, wobei eine

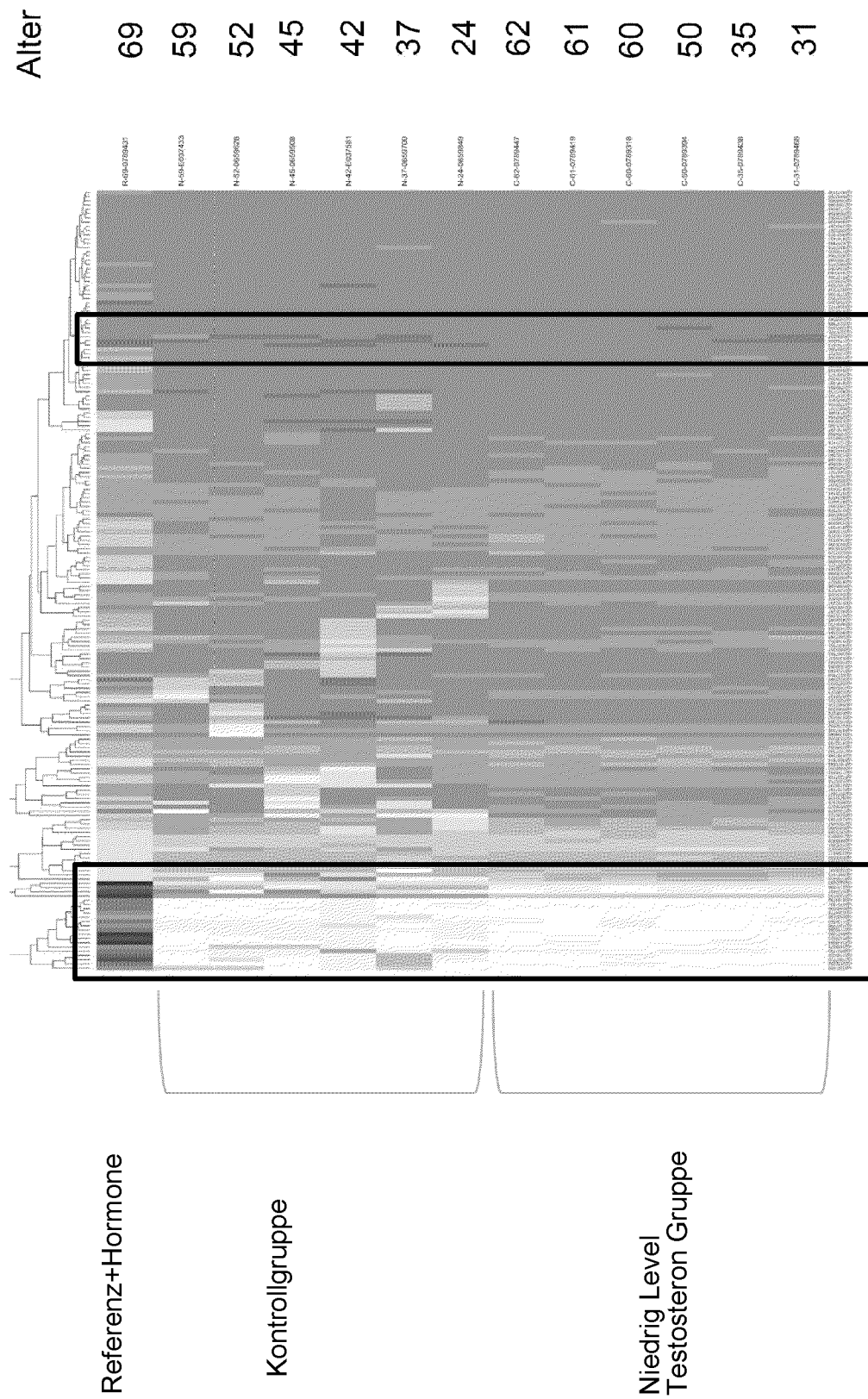
Frühdiagnose oder Früherkennung von Testosteronmangel erfolgt.

6. Verfahren zur Diagnose oder Prognose oder Risikostratifizierung von Patienten mit Testosteronmangel nach einem der vorstehenden Patentansprüche, wobei eine Therapiesteuerung von Testosteronmangel erfolgt, insbesondere Entscheidungen zur Behandlung und Therapie des Patienten, insbesondere Einsatz, Wirkung und / oder Dosierung eines oder mehrerer Arzneimittel, eine therapeutische Maßnahme oder die Überwachung eines Krankheitsverlaufes sowie Therapieverlaufs, Ätiologie oder Klassifizierung einer Erkrankung.
7. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorstehenden Patentansprüche, umfassend Materialien zur Analyse des Methylierungsstatus der CpG-Inseln ausgewählt aus mindestens einer Markersequenz MS No. 1-23, insbesondere ein Oligomer davon.
8. Verwendung eines Kits nach Anspruch 7 zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Patentansprüche 1 bis 6.

Figur 1:



Figur 2:



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2024/068519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6883 (2018.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021262894 A1 (UNIV COLORADO REGENTS [US]; ILLUMINA SOFTWARE INC [US]) 30 December 2021 (2021-12-30) page 21, lines 2-6	7
X	HARBS JUSTIN ET AL. "An epigenome-wide analysis of sex hormone levels and DNA methylation in male blood samples" <i>EPIGENETICS</i> , US, Vol. 18, No. 1, 30 March 2023 (2023-03-30), pages 1-14 DOI: 10.1080/15592294.2023.2196759 ISSN: 1559-2294, XP093109269 table 1, "Age" and "Testosterone, ng/ml"; table 2, "T (Total)", "T (Free)"; table 4, "T (Total)", "T (Free)"; page 11, "Conclusions"	1-6, 8
X	ALMSTRUP KRISTIAN ET AL. "Pubertal development in healthy children is mirrored by DNA methylation patterns in peripheral blood" , US, Vol. 6, No. 1, 28 June 2016 (2016-06-28), pages 1-12, SCIENTIFIC REPORTS, Retrieved from the Internet: https://www.nature.com/articles/srep28657.pdf DOI: 10.1038/srep28657 ISSN: 2045-2322, XP093109676 table 1; figure 2; abstract; page 2 "Differentially methylated CpGs associated with ..."	1-6, 8
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 October 2024		Date of mailing of the international search report 29 October 2024
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands (Kingdom of the) Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Leber, Thomas Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUGRUE VICTORIA J ET AL. "Castration delays epigenetic aging and feminizes DNA methylation at androgen-regulated loci" , Vol. 10, 06 July 2021 (2021-07-06), ELIFE, Retrieved from the Internet: https://cdn.elifesciences.org/articles/64932/elifesciences-64932-v1.xml DOI: 10.7554/eLife.64932 XP093020749 title; abstract; figure 1 "Experiment 2"; page 5, paragraphs 3 and 4; page 11 "Discussion"	1-6, 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2024/068519

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☐ forming part of the international application as filed:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/EP2024/068519

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021262894	A1	30 December 2021	AU	2021297245	A1	02 February 2023
				BR	112022026509	A2	07 March 2023
				CA	3184128	A1	30 December 2021
				CN	116096920	A	09 May 2023
				EP	4168593	A1	26 April 2023
				JP	2023532444	A	28 July 2023
				KR	20230038486	A	20 March 2023
				US	2024093318	A1	21 March 2024
				WO	2021262894	A1	30 December 2021

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12Q1/6883

ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C12Q

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, FSTA

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2021/262894 A1 (UNIV COLORADO REGENTS [US]; ILLUMINA SOFTWARE INC [US]) 30. Dezember 2021 (2021-12-30) Seite 21, Zeilen 2-6	7
X	HARBS JUSTIN ET AL: "An epigenome-wide analysis of sex hormone levels and DNA methylation in male blood samples", EPIGENETICS, Bd. 18, Nr. 1, 30. März 2023 (2023-03-30), Seiten 1-14, XP093109269, US ISSN: 1559-2294, DOI: 10.1080/15592294.2023.2196759 table 1, "Age" and "Testosterone, ng/ml"; table 2, "T (Total)", "T (Free)"; table 4, "T (Total)", "T (Free)"; page 11, "Conclusions"	1-6,8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"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)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Oktober 2024

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/10/2024

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Leber, Thomas

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2024/068519

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist die internationale Recherche auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
 - a) ☒ im Anmeldezeitpunkt Bestandteil der internationalen Anmeldung war.
 - b) ☐ nach dem internationalen Anmeldedatum nur für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht wurde (Regel 13ter.1.a)),
☐ zusammen mit einer Erklärung, wonach das Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht.
2. ☐ Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist dieser Bericht insoweit erstellt worden, als eine sinnvolle Recherche auch ohne ein dem WIPO-Standard ST.26 entsprechendes Sequenzprotokoll durchgeführt werden konnte.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ALMSTRUP KRISTIAN ET AL: "Pubertal development in healthy children is mirrored by DNA methylation patterns in peripheral blood", SCIENTIFIC REPORTS , Bd. 6, Nr. 1 28. Juni 2016 (2016-06-28), Seiten 1-12, XP093109676, US ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/srep28657 Gefunden im Internet: URL:https://www.nature.com/articles/srep28657.pdf table 1; Fig. 2; abstract; page 2 "Differentially methylated CpGs associated with ..." -----	1-6,8
X	SUGRUE VICTORIA J ET AL: "Castration delays epigenetic aging and feminizes DNA methylation at androgen-regulated loci", ELIFE , Bd. 10 6. Juli 2021 (2021-07-06), XP093020749, DOI: 10.7554/eLife.64932 Gefunden im Internet: URL:https://cdn.elifesciences.org/articles/64932/elifesciences-64932-v1.xml title; abstract; Fig. 1 "Experiment 2"; page 5, par. 3 and 4; page 11 "Discussion" -----	1-6,8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2024/068519

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2021262894 A1	30-12-2021	AU 2021297245 A1	02-02-2023
		BR 112022026509 A2	07-03-2023
		CA 3184128 A1	30-12-2021
		CN 116096920 A	09-05-2023
		EP 4168593 A1	26-04-2023
		JP 2023532444 A	28-07-2023
		KR 20230038486 A	20-03-2023
		US 2024093318 A1	21-03-2024
		WO 2021262894 A1	30-12-2021
