

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2008.06.12</b>	(73) Titular(es): <b>HANSA MEDICAL AB</b> <b>P.O. BOX 785 220 07 LUND</b> <b>SE</b>
(30) Prioridade(s): <b>2007.06.12 GB 0711327</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2009.12.09</b>	(72) Inventor(es): <b>LARS BJORCK</b> <b>BERTIL CHRISTENSSON</b> <b>HEIKO HERWALD</b> <b>ADAM LINDER</b> <b>PER AKESSON</b> <b>SE</b> <b>SE</b> <b>SE</b> <b>SE</b> <b>SE</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.03.07</b> <b>109/2012</b>	(74) Mandatário: <b>ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA</b> <b>RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO**

(57) Resumo:

FOI DEMONSTRADO QUE O NÍVEL DE HBP AUMENTA EM INDIVÍDUOS QUE SUBSEQUENTEMENTE DESENVOLVEM SEPSIA GRAVE. DESTE MODO, O NÍVEL DE HBP, A RAZÃO HBP/WBC OU A RAZÃO HBP/CN NUM INDIVÍDUO PODEM SER UTILIZADOS PARA DETERMINAR SE UM INDIVÍDUO ESTÁ OU NÃO EM RISCO DE AÇÃO DESENVOLVER SEPSIA GRAVE.

RESUMO

**"Método de diagnóstico"**

Foi demonstrado que o nível de HBP aumenta em indivíduos que subsequentemente desenvolvem sepsia grave. Deste modo, o nível de HBP, a razão HBP/WBC ou a razão HBP/CN num indivíduo podem ser utilizados para determinar se um indivíduo está ou não em risco de acção desenvolver sepsia grave.

## DESCRIÇÃO

### **"Método de diagnóstico"**

#### **Campo da invenção**

A invenção refere-se ao diagnóstico de susceptibilidade a, e à prevenção do desenvolvimento de sepsia grave.

#### **Anterioridade da invenção**

A sepsia é uma resposta inflamatória sistémica à infecção, que provoca a falha de órgãos e a morte em casos graves. É uma causa cada vez mais comum de morbilidade e mortalidade, particularmente em indivíduos idosos, imunocomprometidos e criticamente doentes. A sepsia foi relatada como a causa mais comum de morte na unidade de cuidados intensivos não coronários (Bone RC *et al.*; *Chest*. 1992 Jun;101 (6):1644-55). Ocorre em 1-2% de todas as hospitalizações e as taxas de mortalidade variam de 20% para a sepsia a 40% para a sepsia grave e >60% para o choque séptico (uma subcategoria de sepsia grave) (Leibovici; *Ann Intern Med* 1991; 114(8):703, Martin *et al.*; *N Engl J Med*. 2003 Apr 17;348(16):1546-54).

A definição clínica da sepsia consiste na presença de duas ou mais das seguintes condições:

- (1) febre (temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$ ) ou hipotermia (temperatura  $<36^{\circ}\text{C}$ );
- (2) ritmo cardíaco  $>90$  batimentos por minuto;
- (3) taxa respiratória  $>20$  inspirações por minuto ou  $\text{PaCO}_2 <32$  mm Hg; e
- (4) contagem de glóbulos brancos do sangue  $>12$  ( $\times 10^9$  células/L) ou  $<4$  ( $\times 10^9$  células/l),

ao mesmo tempo que uma infecção confirmada ou suspeita.

As condições (1) a (4) são conhecidas como critérios de SIRS (do inglês, "Severe Inflammatory Response Síndrome", síndrome de resposta inflamatória grave) (Bone RC *et al.*; *Chest*. 1992 Jun; 101(6):1644-55) e constituem um padrão internacional reconhecido para o diagnóstico de inflamação grave. Um indivíduo que exiba dois ou mais dos critérios de

SIRS sem uma infecção confirmada ou suspeita é classificado como possuindo SIRS não associada a infecção.

A definição clínica de sepsia grave é a sepsia conforme definida acima, associada a hipotensão induzida por sepsia, disfunção de órgãos ou anomalias de perfusão. A hipotensão induzida por sepsia é definida como uma pressão sanguínea sistólica <90 mm Hg ou uma redução <40 mm Hg a partir na linha de base na ausência de outras causas de hipotensão. As anomalias de perfusão podem incluir, mas não se lhes limitando, hipoperfusão, acidose láctica, oligúria, ou uma alteração aguda no estado mental. A sepsia grave inclui, como subcategoria, a condição de choque séptico. Esta condição é especificamente definida pela presença de hipotensão induzida por sepsia apesar de adequada ressuscitação de fluidos juntamente com a presença de anomalias de perfusão. Os indivíduos que recebem agentes inotrópicos ou vasocompressores podem não estar hipotensos no momento em que são medidas as anomalias de perfusão.

Para o tratamento de sepsia grave, o diagnóstico antes do início de sintomas mais graves (hipotensão, disfunção de órgãos ou hipoperfusão) com a instituição de tratamento adequado é da maior importância para um resultado bem-sucedido (Rivers E et al. *N Engl J Med* 2001; 345(19): 1368-77). Por exemplo, Kumar et al. mostraram que a mortalidade estava correlacionada com o número de horas passadas após o início da hipotensão induzida por sepsia antes de ser dado o primeiro tratamento (Kumar et al. *Crit Care Med* 2006;34(6):1589-96). Um marcador biológico ou clínico fiável para determinar tão precocemente quanto possível se um indivíduo está em risco de desenvolver sepsia grave é necessário para minimizar o atraso da instituição do tratamento.

### **Sumário da invenção**

A proteína de ligação a heparina (HBP, CAP37, Azurocidina) é um homólogo de serina-protease glicosilado, de cadeia simples, negativamente carregado, de 37 kDa, inactivo, que exhibe 44% de identidade de sequência com a elastase de neutrófilos humana. A estrutura tridimensional da HBP foi publicada (Iversen et al. *Nat Struct Biol.* 1997 Apr; 4(4):265-8). Está contida nos grânulos azurofílicos de neutrófilos

humanos (Lindmark *et al.*, *J Leukoc Biol* 1999; 66(4):634-43). É uma proteína multifuncional que se mostrou induzir derrame vascular por alteração do equilíbrio do  $\text{Ca}^{2+}$  do citoesqueleto dos vasos sanguíneos (Gautam *et al.*, *Nature Medicine* 2001; 7(10):1123-7). Mostrou-se que a proteína M de estreptococos do grupo A (GAS) em complexo com fibrinogénio induz a libertação de HBP por estimulação do receptor de B2-integrina de neutrófilos (Herwald *et al.*, *Cell* 2004; 116(3):367-79). O LPS pode também induzir libertação de HBP através de um mecanismo desconhecido (Rasmussen *et al.*, *FEBS Lett* 1996; 390(1): 109 12). A sequência de HBP está disponível ao público (por exemplo no NCBI com o número de acesso NP\_001691 REGIÃO: 27..248) e está reproduzida adiante em SEQ ID NO.1

SEQ ID NO: 1

IVGGRKARPRQFPFLASIQNGRHFCGGALIHARFVMTAASCTQSQNPGVSTVVLGAYDLRRRE  
RQSRQTFSSISSMSENGYDPQQNLNDLMLLQLDREANLTSSVTILPLPLQATVEAGTRCQVAGW  
GSQSRSGGRLSRFPRFVNVTVTPEQCRFPNNVCTGVLTTRGGICNCDGCTPLVCEGLAHGVASF  
LGPCGRGPDFFTRVALFRDWIDGVLNPGP

Os níveis de HBP em indivíduos que exibem um ou mais dos critérios de SIRS não foram previamente investigados. Os inventores mostraram pela primeira vez que os níveis de HBP estão aumentados em indivíduos que subsequentemente desenvolvem sepsia grave. Os níveis de HBP estão aumentados até 12 horas antes de ser registada hipotensão induzida por sepsia, mas diminuem rapidamente se for instituída a terapia. Os inventores mostraram também pela primeira vez que a razão HBP/Contagem de glóbulos brancos do sangue (WBC) está elevada em indivíduos que subsequentemente desenvolvem sepsia grave.

De acordo com a invenção, é assim proporcionado um método de identificação se um indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave, método este que compreende a medição da HBP numa amostra de fluido colhida do indivíduo e desse modo a determinação se o indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave.

O método da invenção pode ainda compreender a medição da contagem de WBC ou de neutrófilos (CN) num indivíduo, o cálculo da razão HBP/WBC ou da razão HBP/CN respectivamente, e

desse modo a determinação se o indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave.

O método da invenção pode assim compreender a medição da HBP num indivíduo e o cálculo do nível de HBP/WBC ou a razão HBP/CN num indivíduo, e desse modo a determinação se o indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave.

A invenção adicionalmente proporciona:

- a utilização *in vitro* de um anticorpo específico de HBP, ou de um seu fragmento capaz de ligação a HBP, para determinar se um indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave;
- um *kit* de teste compreendendo um anticorpo específico de HBP, ou um seu fragmento capaz de ligação a HBP, e meios para a medição dos WBC num indivíduo.

Também é divulgado um método de redução do risco de um indivíduo desenvolver sepsia grave compreendendo:

- (i) a determinação se um indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave utilizando um método da invenção; e
- (ii) a administração a um indivíduo identificado em (i) como estando em risco, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente adequado para o tratamento de infecção e/ou fluidos intravenosos.

### **Descrição das Figuras**

A **Figura 1** mostra a concentração de HBP (Figura 1a), as razões HBP/WBC (Figura 1b), os níveis de CRP (Figura 1c), os níveis de IL-6 (Figura 1d) e os níveis de lactato (Figura 1e) no grupo de sepsia grave (n=51), no grupo de sepsia (n=95), no grupo de infecção sem SIRS (n=44) e no grupo de SIRS sem infecção (n=12). Linha dentro da caixa: mediana; lados da caixa: quartis (Q1, Q3); bigodes: gama de valores; x e o: valores de desvio identificados pelo número do paciente. As linhas representam os valores limite de exclusão, para o nível de HBP de 20 ng/ml e para a razão HBP/WBC de 2, para as Figuras 1a e 1b, respectivamente

A **Figura 2** mostra uma curva ROC para o nível de HBP e/ou a razão HBP/WBC, o nível de HBP, a razão HBP/WBC, o lactato, a contagem de glóbulos brancos do sangue, CRP e IL-6. A linha recta de 0,0 a 1,1 é uma linha de referência. Os segmentos diagonais são produzidos por empates.

A **Figura 3** mostra a razão HBP/WBC (Figura 3a) ou a concentração de HBP (Figura 3b) para cada indivíduo (n=51) no grupo de sepsia grave, representadas em função do tempo desde a colheita da primeira amostra de plasma relativamente ao tempo da pressão sanguínea mais baixa medida (indicada pela seta às 0 h). Os círculos a branco na Figura 3a representam pacientes que caem abaixo do nível limite de exclusão da razão HBP/WBC mas estavam classificados acima do nível limite de exclusão da concentração de HBP. Os círculos a branco na Figura 3b representam pacientes que caem abaixo do nível limite de exclusão da concentração de HBP mas estavam classificados acima do nível limite de exclusão da razão HBP/WBC.

A **Figura 4** mostra a alteração na razão HBP/WBC em amostras de plasma consecutivas colhidas de 16 pacientes com sepsia grave ao longo de 96 horas (Figura 4a) e de 7 pacientes com sepsia, infecção sem SIRS ou sem infecção ao longo de 72 horas (Figura 4b). Cada linha representa um paciente individual.

## **Descrição detalhada da invenção**

### ***Diagnóstico***

A presente invenção refere-se a um método de identificação se um indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave. A invenção refere-se portanto ao diagnóstico da susceptibilidade de um indivíduo a sepsia grave. O indivíduo em teste é tipicamente suspeito de estar em risco de desenvolver sepsia grave. O indivíduo é tipicamente um mamífero. O mamífero é tipicamente um ser humano ou um mamífero doméstico tal como um cavalo, uma vaca, uma ovelha, um cão ou um gato. O indivíduo é preferivelmente um ser humano.

O indivíduo pode ser suspeito de estar em risco de desenvolver sepsia grave por ter uma confirmação ou suspeita

de infecção, e/ou apresentar um ou mais, ou dois ou mais, dos critérios de SIRS. Os critérios de SIRS são:

- (1) febre (temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$ ) ou hipotermia (temperatura  $<36^{\circ}\text{C}$ );
- (2) ritmo cardíaco  $>90$  batimentos por minuto;
- (3) taxa respiratória  $>20$  inspirações por minuto ou  $\text{PaCO}_2 <32$  mm Hg; e
- (4) contagem de glóbulos brancos do sangue  $>12$  ( $\times 10^9$  células/L) ou  $<4$  ( $\times 10^9$  células/L).

A infecção confirmada ou suspeita é tipicamente uma ou mais entre uma infecção bacteriana, parasítica ou fúngica. Uma infecção bacteriana pode ser causada por uma ou mais bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas. A uma ou mais bactérias Gram-negativas podem ser seleccionadas entre *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* (tipicamente *K.pneumoniae* ou *K.oxytoca*), *Enterobacter spp.* (tipicamente *E.cloacae* ou *E.aerogenes*), *Bordetella spp.* (tipicamente *B.bronchiseptica*, *B. pertussis* ou *B.parapertussis*), *Chlamydia spp.* (tipicamente *C. trachomatis*), *Legionella spp.* (tipicamente *L. pneumophila*), *Pseudomonas spp.* (tipicamente *P.aeruginosa*), *Mycoplasma spp.* (tipicamente *M. pneumoniae*), *Haemophilus influenza*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Neisseria meningitidis* (tipicamente do serogrupo A, B, C, H, I, K, L, X, Y, Z, 29E ou W135). A uma ou mais bactérias Gram-positivas podem ser seleccionadas entre *Staphylococcus spp.* (tipicamente *S. aureus* ou *Staphylococci* negativos para Coagulase), *Streptococcus spp.* (tipicamente *S. pneumoniae* ou *S. pyogenes*) e *Enterococcus spp.* (tipicamente *E. faecium* ou *E. faecalis*). Uma infecção fúngica pode ser causada por um ou mais fungos seleccionados entre *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Aperigillus fumigatus*.

A infecção, confirmada ou suspeita, pode afectar qualquer parte do corpo. Os exemplos típicos incluem uma infecção que afecta os pulmões; o tracto respiratório; o fígado; os rins; o tracto urinário; a pele (cutânea e subcutânea); o coração; o estômago; os intestinos; o sangue; os ossos; as articulações ou qualquer sua combinação. A infecção confirmada ou suspeita pode ser meningite.



A infecção pode ser confirmada por práticas de diagnóstico conhecidas na especialidade, por exemplo cultura microbiana de amostras colhidas do indivíduo, teste aos antigénios na urina ou outras amostras de fluidos colhidas do indivíduo (especialmente para infecções por *S. pneumoniae* e *Legionella sp.*) ou análise por PCR (especialmente para pneumonia atípica causada por infecção bacteriana e.g. *Mycoplasma*, *Legionella*, *Chlamydia* e *B. pertussis*). Mais recentemente foram desenvolvidas técnicas de PCR multiplex que permitem o teste simultâneo de múltiplas infecções bacterianas e fúngicas.

A infecção pode ser suspeita devido à presença de um ou mais dos seguintes sintomas gerais: febre superior a 38°C; arrepios; dor; uma dor maçante persistente ou sensibilidade; sensação geral de cansaço; suores nocturnos; e uma ferida ou incisão com vermelhidão, calor, inchaço ou dor associados, ou que exsude um fluido que é branco, amarelado ou esverdeado.

A presente invenção pode ser utilizada para confirmar a susceptibilidade de um indivíduo com um ou mais factores de risco adicionais e/ou uma ou mais predisposições para o desenvolvimento de sepsia grave. Os factores de risco que aumentam a susceptibilidade para o desenvolvimento de sepsia grave incluem tipicamente qualquer factor que aumente a susceptibilidade a infecção. Estes factores podem incluir um sistema imunitário enfraquecido (i.e. o indivíduo é imunocomprometido), ou a presença num paciente hospitalizado de uma linha intravenosa, ferida cirúrgica, dreno cirúrgico, ou um local de quebra da pele conhecido como úlceras de decúbito ou úlceras de pressão. Um indivíduo diabético é mais propenso ao desenvolvimento de sepsia grave. O método de diagnóstico da invenção pode ser realizado em conjunto com outro ensaio ou teste genético para refinar a previsão do risco.

Tipicamente, o indivíduo não possui uma doença crónica associada a inflamação e/ou não exhibe sintomas que estão especificamente associados com estas doenças. Os exemplos destas doenças incluem aterosclerose, doença de Alzheimer, asma, artrite reumatóide, osteoartrite e doenças inflamatórias do intestino tais como a doença de Crohn, a colite ulcerativa,

a síndrome do intestino irritável e a doença inflamatória dos intestinos. Se o indivíduo tem uma doença crónica associada a inflamação, tem adicionalmente uma infecção confirmada ou suspeita como definido acima e/ou apresenta um ou mais, ou dois ou mais, dos critérios de SIRS.

Tipicamente, o indivíduo não tem sepsia grave nem exhibe sintomas que possam conduzir a um diagnóstico de sepsia grave. Tipicamente, estes sintomas incluem hipotensão induzida por sepsia, disfunção de órgãos ou anomalias de perfusão. A hipotensão induzida por sepsia é definida como uma pressão sanguínea sistólica <90 mm Hg ou uma redução <40 mm Hg a partir na linha de base na ausência de outras causas de hipotensão. As anomalias de perfusão podem incluir, mas não se lhes limitando, hipoperfusão, acidose láctica, oligúria ou uma alteração aguda no estado mental. A sepsia grave inclui, como subcategoria, a condição de choque séptico. Esta condição é especificamente definida pela presença de hipotensão induzida por sepsia apesar de adequada ressuscitação de fluidos juntamente com a presença de anomalias de perfusão. Os indivíduos que recebem agentes inotrópicos ou vasocompressores podem não estar hipotensos no momento em que são medidas as anomalias de perfusão.

A presente invenção envolve a medição do nível de HBP num indivíduo. Tipicamente, o nível de HBP é medido pela determinação da concentração de HBP numa amostra de fluido colhida do indivíduo. De acordo com a presente invenção, um nível aumentado de HBP comparativamente com o nível ou concentração na linha de base indica que o indivíduo é susceptível a, ou está em risco de desenvolver, sepsia grave. O nível na linha de base é tipicamente o nível de HBP num indivíduo que se suspeita estar em risco de desenvolver sepsia grave mas não desenvolve subsequentemente sepsia grave. Por exemplo, os inventores mostraram que, quando o nível de HBP é medido pela determinação da concentração de HBP numa amostra de plasma colhida de um indivíduo, os indivíduos que não desenvolvem sepsia grave têm uma concentração mediana de HBP de cerca de 8,5 ng/ml, os indivíduos que têm uma infecção confirmada ou suspeita mas exibem um ou menos critérios de SIRS têm uma concentração mediana de HBP de cerca de 6,5 ng/ml, e os indivíduos que apresentam dois ou mais

critérios de SIRS na ausência de infecção têm uma concentração mediana de HBP de cerca de 9 ng/ml. A concentração mediana de HBP para todas as categorias de indivíduos que se suspeita estarem em risco de desenvolver sepsia grave mas não desenvolvem subsequentemente sepsia grave é de cerca de 8 ng/ml.

Na presente invenção, numa amostra de fluido colhida de um indivíduo, uma concentração aumentada de HBP associada a um aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é tipicamente superior a cerca de 15 ng/ml, ou superior a cerca de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24 ng/ml. A concentração aumentada de HBP associada a um aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é preferivelmente superior a cerca de 20 ng/ml.

De acordo com a presente invenção, o aumento no nível ou concentração de HBP associado a aumento de susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é de pelo menos 2 vezes, 2,5 vezes ou 3 vezes relativamente ao nível ou concentração na linha de base. O aumento no nível ou concentração de HBP associado a aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é preferivelmente de pelo menos 2,5 vezes relativamente ao nível ou concentração na linha de base.

A presente invenção pode portanto também envolve a determinação da razão HBP/contagem de glóbulos brancos do sangue (WBC) para determinar o risco de desenvolvimento de sepsia grave.

De acordo com a presente invenção, uma razão HBP/WBC aumentada comparativamente com a razão na linha de base indica que o indivíduo é susceptível a, ou está em risco de desenvolver sepsia grave. A razão na linha de base é tipicamente a razão HBP/WBC num indivíduo que se suspeita estar em risco de desenvolver sepsia grave mas não desenvolve subsequentemente sepsia grave. Quando a concentração de HBP numa amostra de fluido é medida em ng/ml e os WBC numa amostra de sangue são medidos em número de células  $\times 10^9/L$ , os inventores mostraram que, por exemplo, indivíduos que não

desenvolvem sepsia grave têm uma razão HBP/WBC mediana de cerca de 0,7:1, os indivíduos que têm uma infecção confirmada ou suspeita mas exibem um ou menos critérios de SIRS têm uma razão HBP/WBC mediana de cerca de 0,85:1, e os indivíduos que apresentam dois ou mais critérios de SIRS na ausência de infecção têm uma razão HBP/WBC mediana de cerca de 0,9:1. A razão HBP/WBC mediana para todas as categorias de indivíduos que se suspeita estarem em risco de desenvolver sepsia grave mas não desenvolvem subsequentemente sepsia grave é de cerca de 0,75:1.

Na presente invenção, quando a concentração de HBP numa amostra de fluido é medida em ng/ml e a contagem de WBC numa amostra de sangue é medida em número de células  $\times 10^9/L$ , uma razão HBP/WBC aumentada associada com um aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é tipicamente superior a cerca de 1,4:1, ou superior a cerca de 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2,0:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1 ou 2,4:1. A razão HBP/WBC aumentada associada com um aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é preferivelmente superior a cerca de 2,0:1.

De acordo com a presente invenção, o aumento na razão HBP/WBC associado com um aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é de pelo menos 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes ou 3 vezes relativamente à razão na linha de base. O aumento na razão HBP/WBC associado com um aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é preferivelmente de pelo menos 2,5 vezes relativamente à razão na linha de base.

Os presentes inventores determinaram a contagem média de neutrófilos (CN) em indivíduos suspeitos de estarem em risco de desenvolver sepsia grave é de cerca de 80% da contagem de glóbulos brancos do sangue (WBC). A presente invenção pode também determinar a razão de HBP/CN para determinar o risco de desenvolvimento sepsia grave.

De acordo com a presente invenção, uma razão HBP/CN aumentada comparativamente com a razão na linha de base indica que um indivíduo é susceptível a, ou está em risco de

desenvolver sepsia grave. A razão na linha de base é tipicamente a razão HBP/CN num indivíduo que não tem uma infecção e/ou não exibe qualquer dos critérios de SIRS. Quando a concentração de HBP numa amostra de fluido é medida em ng/ml e a contagem de CN numa amostra de sangue é medida em número de células  $\times 10^9/L$ , os inventores mostraram que, por exemplo, os indivíduos que não desenvolvem sepsia grave têm uma razão HBP/CN mediana de cerca de 0,55:1, os indivíduos que têm uma infecção confirmada ou suspeita mas apresentam um ou menos critérios de SIRS têm uma razão HBP/CN mediana de cerca de 0,65:1, e os indivíduos que apresentam dois ou mais critérios de SIRS na ausência de infecção têm uma razão HBP/CN mediana de cerca de 0,7:1. A razão HBP/CN mediana para todas as categorias de indivíduos que se suspeita estarem em risco de desenvolver sepsia grave mas não desenvolvem subsequentemente sepsia grave é de cerca de 0.6:1.

Na presente invenção, quando a concentração de HBP numa amostra de fluido é medida em ng/ml e a contagem de CN numa amostra de sangue é medida em número de células  $\times 10^9/L$ , uma razão HBP/CN aumentada associada com um aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é tipicamente superior a cerca de 1,1:1, ou superior a cerca de 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1 ou 1,9:1. A razão HBP/CN aumentada associada com um aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é preferivelmente superior a cerca de 1,6:1.

De acordo com a presente invenção, o aumento na razão HBP/CN associado com um aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é de pelo menos 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes ou 3 vezes relativamente à razão na linha de base. O aumento na razão HBP/CN associado com um aumento da susceptibilidade a, ou do risco de desenvolvimento de sepsia grave é preferivelmente de pelo menos 2,5 vezes relativamente à razão na linha de base.

A invenção é tipicamente realizada *in vitro* numa amostra obtida do indivíduo. A amostra tipicamente compreende um fluido corporal do indivíduo. A amostra é preferivelmente uma amostra de sangue, plasma, soro, urina, fluido cefalorraquidiano ou fluido articular. A amostra é muito preferivelmente uma

amostra de sangue. A amostra é tipicamente processada antes de ser ensaiada, por exemplo por centrifugação. A amostra pode também ser tipicamente armazenada antes do ensaio, preferivelmente abaixo de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Podem ser utilizados métodos padrão conhecidos na especialidade para ensaiar o nível de HBP. Estes métodos tipicamente envolvem a utilização de um agente para a detecção de HBP. O agente tipicamente liga-se especificamente a HBP. O agente pode ser um anticorpo específico para HBP. Por específico, deve entender-se que o agente ou o anticorpo se liga a HBP sem reactividade cruzada significativa com qualquer outra molécula, particularmente qualquer outra proteína. Por exemplo, um agente ou anticorpo específico para HBP não apresentará reactividade cruzada significativa com elastase de neutrófilos humana. A reactividade cruzada pode ser determinada por qualquer método adequado.

Um anticorpo utilizado no método da invenção pode ser um anticorpo completo ou um seu fragmento que seja capaz de se ligar a HBP. O anticorpo pode ser monoclonal. Um anticorpo completo é tipicamente um anticorpo que é produzido por qualquer método adequado conhecido na especialidade. Por exemplo, os anticorpos policlonais podem ser obtidos por imunização de um mamífero, tipicamente um coelho ou um ratinho, com HBP, sob condições adequadas, e isolamento das moléculas de anticorpo, por exemplo, do soro do referido mamífero. Os anticorpos monoclonais podem ser obtidos por métodos recombinantes ou de hibridomas.

Os métodos de hibridomas envolvem a imunização de um mamífero, tipicamente um coelho ou um ratinho, com HBP, sob condições adequadas, depois a colheita das células do baço do referido mamífero e a sua fusão com células de mieloma. A mistura de células fundidas é então diluída e são crescidos clones a partir de células individuais progenitoras. Os anticorpos segregados pelos diferentes clones são então testados quanto à sua capacidade para se ligarem a HBP, e o clone mais produtivo e estável é então crescido em meio de cultura até um volume elevado. O anticorpo segregado é colhido e purificado.

Os métodos recombinantes envolvem a clonagem em fagos ou leveduras de diferentes segmentos de genes de imunoglobulina para criar bibliotecas de anticorpos com sequências de aminoácidos ligeiramente diferentes. As sequências que originam anticorpos que se ligam a HBP podem ser seleccionadas e as sequências podem ser clonadas, por exemplo, numa linha de células bacterianas, para produção.

Tipicamente, o anticorpo é um anticorpo de mamífero, tal como um anticorpo de primata, humano, de roedor (e.g. ratinho ou rato), de coelho, ovino, porcino, equino ou de camelo. O anticorpo pode ser um anticorpo camelídeo ou anticorpo de tubarão. O anticorpo pode ser um "nanocorpo". O anticorpo pode ser qualquer classe ou isotipo de anticorpo, por exemplo IgM, mas é preferivelmente IgG.

O fragmento de anticorpo completo que pode ser utilizado no método compreende um local de ligação ao antigénio, e.g. fragmentos Fab ou F(ab)2. O anticorpo completo ou fragmento podem estar associados a outras porções, tais como ligantes, que podem ser utilizados para juntar 2 ou mais fragmentos ou anticorpos. Estes ligantes podem ser ligantes químicos ou podem estar presentes na forma de uma proteína de fusão com o fragmento ou o anticorpo completo. Os ligantes podem assim ser utilizados para juntar anticorpos completos ou fragmentos que têm as mesmas ou diferentes especificidades de ligação, e.g. que se podem ligar ao mesmo ou a diferentes polimorfismos. O anticorpo pode ser um anticorpo biespecífico que é capaz de se ligar a dois antigénios diferentes, tipicamente quaisquer dois dos polimorfismos aqui mencionados. O anticorpo pode ser um 'diacorpo' formado pela união de dois domínios variáveis "costas com costas". No caso em que os anticorpos utilizados no método estão presentes em qualquer das formas anteriores que têm diferentes locais de ligação ao antigénio de diferentes especificidades, então estas diferentes especificidades são tipicamente para com polimorfismos em diferentes posições ou em diferentes proteínas. Numa concretização, o anticorpo é um anticorpo quimérico compreendendo sequências de diferentes anticorpos naturais, por exemplo um anticorpo humanizado.

Os métodos para determinar o nível de HBP envolvem tipicamente o contacto de uma amostra com um agente ou um anticorpo capazes de se ligarem especificamente a HBP. Estes métodos podem incluir testes de vareta ("dipstick") e um ensaio imunossorvente com enzima ligada (ELISA). Tipicamente, os testes de vareta compreendem um ou mais anticorpos ou proteínas que ligam especificamente HBP. Se estiver presente mais do que um anticorpo, os anticorpos preferivelmente possuem diferentes determinantes não sobrepostos de modo a que se possam ligar simultaneamente a HBP.

O ELISA é um ensaio em fase sólida, heterogénea, que requer a separação de reagentes. O ELISA é tipicamente realizado utilizando a técnica de sanduíche ou a técnica competitiva. A técnica de sanduíche requer dois anticorpos. O primeiro liga-se especificamente a HBP e está ligado a um suporte sólido. O segundo anticorpo está ligado a um marcador, tipicamente um conjugado enzimático. É utilizado um substrato para a enzima para quantificar o complexo HBP-anticorpo e portanto a quantidade de HBP numa amostra. O ensaio de inibição competitiva de antigénio também requer tipicamente um anticorpo específico para HBP ligado a um suporte. Um conjugado HBP-enzima é adicionado à amostra (contendo HBP) a ensaiar. A inibição competitiva entre o conjugado HBP-enzima e a HBP marcada permite a quantificação da quantidade de HBP numa amostra. Os suportes sólidos para reacções de ELISA preferivelmente contêm poços.

A presente invenção pode também empregar métodos de medição de HBP que não compreendem anticorpos. A separação por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) e detecção por fluorescência é preferivelmente utilizada como método de determinação do nível de HBP. Podem ser utilizados aparelhos de HPLC e métodos como os descritos previamente (Tsikas D *et al.* *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 705: 174-6). A separação durante a HPLC é tipicamente realizada com base na dimensão ou na carga. Antes da HPLC, aminoácidos endógenos e um padrão interno de L-homoarginina são tipicamente adicionados às amostras de ensaio e estas são extraídas por fases em cartuchos CBA (Varian, Harbor City, CA). Os aminoácidos no interior das amostras são preferivelmente derivatizados com o-ftalaldeído (OPA). A exactidão e a



precisão do ensaio são preferivelmente determinadas com amostras de controlo de qualidade para todos os aminoácidos.

Podem ser utilizados métodos padrão conhecidos na especialidade para medir a contagem de glóbulos brancos do sangue ou a contagem de neutrófilos num indivíduo. Estes métodos incluem contagem automática ou manual.

A invenção proporciona ainda um *kit* de diagnóstico que compreende meios para medição do nível de HBP num indivíduo e desse modo a determinação se o indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave. O *kit* contém tipicamente um ou mais anticorpos que se ligam especificamente a HBP. Por exemplo, o *kit* pode compreender um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo de cadeia única, um anticorpo quimérico, um anticorpo com enxerto de CDR ou um anticorpo humanizado. O anticorpo pode ser uma molécula intacta de imunoglobulina ou um seu fragmento tal como um fragmento Fab,  $F(ab')_2$  ou Fv. Se estiverem presentes mais do que um anticorpo, os anticorpos têm preferivelmente diferentes determinantes não sobrepostos de modo a que se possam ligar simultaneamente a HBP.

O *kit* pode adicionalmente compreender meios para a medição da contagem de WBC num indivíduo.

O *kit* pode adicionalmente compreender um ou mais outros reagentes ou instrumentos que permitam realizar qualquer das concretizações do método acima mencionadas. Estes reagentes ou instrumentos incluem um ou mais dos seguintes: tampão(ões) adequado(s) (soluções aquosas), meios para isolar HBP da amostra, meios para obter uma amostra do indivíduo (tal como um vaso ou um instrumento compreendendo uma agulha) ou um suporte compreendendo poços nos quais possam ser realizadas reacções quantitativas. O *kit* pode, opcionalmente, compreender instruções para permitir que o *kit* seja utilizado no método da invenção ou detalhes relativos a que indivíduos o método pode ser aplicado.

### **Terapia**

É também divulgado o tratamento de um indivíduo identificado por um método da invenção como estando em risco

de desenvolver sepsia grave. Assim, uma substância para utilização na redução do risco de desenvolvimento de sepsia grave pode ser utilizada no fabrico de um medicamento para utilização no tratamento de um indivíduo identificado por um método da invenção como estando em risco de desenvolver sepsia grave. A condição de um indivíduo identificado por um método da invenção como estando em risco de desenvolver sepsia grave pode portanto ser melhorada pela administração de uma tal substância. A sepsia grave pode assim ser prevenida. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma substância útil para reduzir o risco de desenvolvimento de sepsia grave pode ser dada a um indivíduo identificado por um método da invenção como dele necessitado. As substâncias adequadas para a redução do risco de desenvolvimento de sepsia grave incluem tipicamente um ou mais antibióticos e/ou um ou mais fluidos intravenosos. Os um ou mais antibióticos são tipicamente antibióticos de largo espectro. Os antibióticos de largo espectro são tipicamente seleccionados entre um ou mais aminoglicósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos, penicilinas, sulfonamidas ou tetraciclinas. Por exemplo, os antibióticos adequados incluem, mas não se lhes limitando, Gentamicina, Canamicina, Neomicina, Estreptomicina, Tobramicina, Cefazolina, Cefalexina, Cefapirina, Cefradina, Cefuroxima, Cefixima, Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftizoxima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Ofloxacina, Clindamicina, Azitromicina, Claritromicina, Eritromicina, Amoxicilina, Ampicilina, Ampicilina-Sulbactama, Cloxacilina, Dicloxacilina, Mezlocilina, Nafcillina, Oxacillina, Penicilina G Benzatina, Penicilina G Potássio, Penicilina G Procaína, Penicilina V Potássio, Piperacilina, Ticarcilina, Ticarcilina-Clavulanato potássio, Pirimetamina-Sulfadoxina, Sulfadizina, Sulfisoxazole, Sulfmetoxazole, Trimetoprim-sulfametoxazole, Clortetraciclina, Doxyciclina e Tetraciclina.

Uma substância útil para a redução do risco de desenvolvimento de sepsia grave de acordo com a invenção é tipicamente formulada para administração na presente invenção com um transportador ou diluente farmacêuticamente aceitáveis. O transportador ou diluente farmacêutico pode ser, por exemplo, uma solução isotónica. Por exemplo, as formas orais sólidas podem conter, juntamente com a substância activa,

diluentes, e.g. lactose, dextrose, sacarose, celulose, amido de milho ou amido de batata; lubrificantes, e.g. sílica, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio ou cálcio, e/ou polietilenoglicóis; agentes de ligação; e.g. amidos, goma-arábica, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou polivinilpirrolidona; agentes desagregantes, e.g. amido, ácido algínico, alginatos ou amido-glicolato de sódio; misturas efervescentes; corantes; edulcorantes; agentes molhantes, tais como lecitina, polissorbatos, laurilsulfatos; e, em geral, substâncias não tóxicas e farmacologicamente inactivas utilizadas em formulações farmacêuticas. Estas preparações farmacêuticas podem ser fabricadas de maneiras conhecidas, por exemplo, por meio de processos de mistura, granulação, conformação em comprimidos, revestimento com açúcar, ou revestimento com película.

As dispersões líquidas para administração oral podem ser xaropes, emulsões ou suspensões. Os xaropes podem conter como transportadores, por exemplo, sacarose ou sacarose com glicerina e/ou manitol e/ou sorbitol.

As suspensões e emulsões podem conter como transportador, por exemplo uma goma natural, ágar, alginato de sódio, pectina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou poli(álcool vinílico). As suspensões ou soluções para injeções intramusculares podem conter, juntamente com a substância activa, um transportador farmacêuticamente aceitável, e.g. água estéril, azeite, oleato de etilo, glicóis, e.g. propilenoglicol, e se desejado, uma quantidade adequada de cloridrato de lidocaína.

As soluções para infusão ou administração intravenosa podem conter como transportador, por exemplo, água estéril ou preferivelmente podem estar na forma de soluções salinas isotónicas, aquosas, estéreis.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma substância utilizada na prevenção de sepsia grave é administrada a um paciente identificado de acordo com um método da invenção. A dose, por exemplo de um antibiótico, podem ser determinada de acordo com vários parâmetros, especialmente de acordo com a substância utilizada; a idade, peso e condição do paciente a

tratar; a via de administração; e o regime requerido. Novamente, um médico estará capacitado para determinar a via de administração e a dosagem requeridas para qualquer paciente particular. Uma dose diária típica é de cerca de 0,1 a 50 mg por kg de peso corporal, de acordo com a actividade do antibiótico específico, a idade, peso e condições do indivíduo a tratar e com a frequência e via de administração. Preferivelmente, os níveis de dosagem diária são de 5 mg a 2 g. Essa dose pode ser proporcionada na forma de um única dose ou pode ser proporcionada na forma de múltiplas doses, por exemplo tomadas a intervalos regulares, por exemplo 2, 3 ou 4 doses administradas diariamente.

O Exemplo que se segue ilustra a invenção:

### **Exemplo**

#### **1. Métodos**

##### **Participantes no Estudo**

Arrolaram-se 202 pacientes adultos com infecção clinicamente suspeita num estudo de prospecção na Infectious Disease Clinic, Lund University Hospital, Suécia, entre Março de 2006 e Abril de 2007. Os critérios de inclusão foram febre  $>38^{\circ}\text{C}$  e tratamento com antibióticos durante menos de 24 horas. A duração do tratamento com antibióticos, a demografia, os critérios de SIRS e a pressão sanguínea sistólica (SBP) foram registados na admissão. Analisaram-se a proteína C-reativa (CRP), o lactato e a contagem de WBC, e obtiveram-se amostras de plasma para posterior análise dos níveis de HBP, e de IL-6 às 12 horas após a admissão. Em 20 pacientes obtiveram-se amostras de plasma em série durante até 96 horas em paralelo com o registo dos critérios de SIRS e da SBP. Após descarga, o diagnóstico final e a mortalidade em 28 d foram registadas e os pacientes foram classificados de acordo com os critérios de SIRS (Bone et al., *Chest* 1992; 101(6): 1644-55).

A sepsia grave (grupo 1) foi definida como a presença de sepsia e SBP  $<90$  mmHg ou uma queda de SBP  $>40$  mmHg a partir na linha de base em 24 h após a colheita das amostras de sangue, a sepsia (grupo 2) foi definida como a exibição de dois ou mais critérios de SIRS juntamente com uma infecção, a ausência de sepsia (grupo 3) foi definida como a exibição de

um critério de SIRS juntamente com uma infecção, e a ausência de infecção (grupo 4) foi definida como a exibição de dois ou mais critérios de SIRS juntamente com um diagnóstico final não infeccioso.

Os diagnósticos finais de infecção foram de pneumonia (n=61), infecção do tracto respiratório superior (n=35), infecção do tracto urinário (n=38), infecção cutânea e subcutânea (n=29), endocardite (n=4), gastroenterite (n=12), ou outras infecções incluindo infecções tropicais (n=11). Em 35 pacientes (17%) foi diagnosticada bacteriemia (17 bactérias Gram-negativas e 18 Gram-positivas). Os diagnósticos não infecciosos com exibição de dois ou mais critérios de SIRS foram de embolia pulmonar e vasculite sistémica). As amostras de sangue foram colhidas em tubos de plástico de citrato para plasma de 4 mL, imediatamente centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min, alocadas e armazenadas a -70°C até à análise.

#### **Análise de HBP, IL-6, CRP, lactato, WBC e razão HBP/WBC**

A concentração de HBP (ng/ml) foi determinada através de um ELISA de sanduíche como descrito em (Tapper *et al.*; *Blood* 2002; 99(5): 1785-93). Diluíram-se de 1/40 as amostras de plasma em PBS e correram-se em duplicado. A HBP humana recombinante foi produzida e purificada como descrito em (Rasmussen *et al.*; *FEBS Lett* 1996; 390(1):109-12). Prepararam-se anticorpos monoclonais de ratinho (2F23A) e anti-soro de coelho (409A) contra HBP recombinante e purificaram-se como descrito em (Lindmark *et al.*; *J. Leukoc. Biol* 1999; 66(4):634-43) e utilizaram-se a 1/3000 e 1/7000 respectivamente. Utilizaram-se IgG de cabra anti-coelho conjugadas com peroxidase de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA), a 1/3000. Calculou-se uma razão HBP/WBC dividindo a concentração de HBP (ng/ml) pelos WBC ( $\times 10^9$  células/L).

A IL-6 foi medida com um *kit* comercial para IL-6 humana (Quantikine, R&D Systems, RU), limite de detecção de 3 pg/mL. Diluíram-se as amostras de plasma de 1/40. Realizaram-se análises da CRP e do lactato num Roche Hitachi Modular-P com reagentes da Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha) de acordo com a descrição do fabricante com a excepção de que as amostras para a análise do lactato foram tomadas de tubos de plasma em citrato em vez de tubos de oxalato-fluoreto.

A contagem de glóbulos brancos do sangue (WBC) foi medida num Sysmex XE2100 de acordo com a descrição do fabricante (Sysmex).

### **Análise Estatística**

Os resultados estão apresentados como medianas, gamas interquartil. O teste de significância foi realizado utilizando o teste da soma de postos de Mann-Whitney. Um valor  $p$  bicaudado  $<0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As curvas ROC (do inglês, "Receiver-Operating Characteristic") (DeLong et al.; *Biometrics* 1988; 44(3): 837-45) e a área sob a curva (AUC) foram determinadas para HBP, razão HBP/WBC, CRP, WBC e IL-6. Os valores da AUC estão reportados com o intervalo de confiança de 95% (95% IC). As sensibilidades, as especificidades, os valores preditivos positivos e os valores preditivos negativos foram calculados a partir de tabulações cruzadas. A razão de probabilidade positiva e a razão de probabilidade negativa estão também reportadas na Tabela 1.

## **2. Resultados**

### **Características dos Participantes no Estudo**

Incluíram-se 202 pacientes que cumpriam os critérios de inclusão. Os pacientes foram classificados nos 4 grupos que se seguem: 51 pacientes com sepsia grave (grupo 1), 95 pacientes com sepsia (grupo 2), 44 pacientes sem sepsia (grupo 3) e 12 pacientes sem infecção (grupo 4), a idade mediana e a razão masculino/feminino dos 4 grupos eram 62 anos; 31/20, 57 anos; 42/53, 44 anos; 15/29, e 73 anos; 11/1 respectivamente. Encontrou-se bacteriemia em 22, 11 e 2 pacientes nos grupos 1, 2, e 3, respectivamente.

### **Análise dos níveis de HBP e razões HBP/WBC em Participantes no Estudo**

Na admissão, os níveis de HBP eram significativamente superiores no grupo da sepsia grave ( $p<0,0001$ ) (Fig. 1a), com 42/51 pacientes excedendo um nível limite de exclusão de 20 ng/ml, em comparação com 1/95, 0/44 e 0/12 pacientes no grupo 2, no grupo 3 e no grupo 4, respectivamente. Também, os pacientes no grupo da sepsia grave apresentavam razões HBP/WBC

significativamente superiores ( $p < 0,0001$ ) em comparação com os outros grupos (Fig. 1b). Encontrou-se uma razão HBP/WBC acima de 2,0 em 44/51 pacientes no grupo da sepsia grave, 2/95 pacientes no grupo da sepsia, 0/44 pacientes no grupo sem sepsia e 0/12 pacientes no grupo sem infecção. Adicionalmente, no grupo da sepsia grave, 47/51 pacientes tinham um nível plasmático de HBP  $>20$  ng/ml ou uma razão HBP/WBC  $>2,0$ , em comparação com 2/95 pacientes no grupo da sepsia e 0 pacientes nos outros 2 grupos (Tabela 1).

Similarmente, os níveis de CRP, IL-6 e lactato eram também significativamente superiores ( $p=0,003$ ,  $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ) no grupo da sepsia grave embora houvesse uma considerável sobreposição entre os grupos (Fig. 1 c-e).

#### **Análise do valor preditivo do nível de HBP e da razão HBP/WBC**

Assumindo uma prevalência de 25% de sepsia grave, como no presente estudo, as variáveis seguintes apresentaram melhor especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de probabilidade positiva (RPP) e razão de probabilidade negativa (RPN) no diagnóstico de sepsia grave comparativamente com todos os diferentes níveis limite de exclusão de CRP e IL-6 calculados:

- um nível de HBP  $>20$  ng/ml indica que o indivíduo irá desenvolver sepsia grave; ou
- uma razão HBP/WBC  $>2,0$  indica que o indivíduo irá desenvolver sepsia grave; ou
- um nível de HBP  $>20$  ng/ml ou uma razão HBP/WBC  $>2,0$  indicam que o indivíduo irá desenvolver sepsia grave.

Estas verificações estão resumidas nas Tabelas 1a, 1b e 1c, e são suportadas pela curva ROC (figura 2). A análise estatística da curva ROC está mostrada na tabela 2.

#### **Nível de HBP e razão HBP/WBC prevêem sepsia grave antes do início de sintomas clínicos**

Em 20 dos 51 pacientes no grupo da sepsia grave, o valor de HBP estava elevado até 12h antes de ser atingida a SBP mais baixa (figuras 3a e 3b). Os níveis de HBP diminuíram rapidamente em 24h nos 11 pacientes que foram tratados com antibióticos adequados e fluidos intravenosos e que recuperaram sem complicações. Em 5 casos em que os pacientes

continuaram a ser instáveis do ponto de vista circulatório, os níveis de HBP, contudo, permaneceram elevados, 1 destes paciente morreu 28 dias depois da data de inclusão (Fig. 4a).

Os 5 pacientes que morreram eram todos do grupo da sepsia grave e todos morreram 1-4 dias após a última colheita de amostra com HBP elevada. Os níveis de HBP permaneceram bem abaixo de 20 ng/ml em 6 pacientes com sepsia e 1 paciente sem sepsia que foram seguidos com amostragens em série (fig. 4b).

20 pacientes no grupo da sepsia grave tinham níveis de HBP ou razões HBP/WBC aumentados na admissão mas SBP normal, indicando que estes indicadores eram capazes de prever a sepsia grave antes se ser possível o diagnóstico clínico padrão. Isto é exemplificado por uma mulher de 70 anos que se apresentava com um historial de 3 dias de febre, diarreia e vômitos. O exame físico foi normal excepto quanto à febre de 38°C, pulsação de 100 mas SBP normal de 130 mm/Hg, e foi hospitalizada com uma tentativa de diagnóstico de gastroenterite. Foram-lhe dados 1000 ml de fluido cristalóide i.v.. Seis horas mais tarde desenvolveu hipotensão grave com SBP de 70 mm/Hg, dificuldade respiratória e foi imediatamente transferida para a UCI, onde mais tarde foi diagnosticada SDRA (Síndrome da Dificuldade Respiratória do Adulto) com coagulação intravascular disseminada devido a septicemia por *E.coli*. Na admissão o seu nível de HBP era de 80 ng/ml e a razão HBP/WBC era 4,2.



Tabela 1a: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de probabilidade negativa e razão de probabilidade positiva de variáveis testadas no diagnóstico de sepsia bacteriana grave

Variável	Limite de exclusão	Sensibilidade %	Especificidade %	VPP %	VPN %	RPP	RPN
HBP (ng/ml)	>20	82,4	99,3	97,7	94,3	118	0,18
razão HBP/WBC	>2	86,3	98,7	95,6	95,5	66,4	0,14
razão HBP/WBC ou nível de HBP (ng/ml)	>2 ou >20	92,2	98,7	95,9	97,4	71	0,08
CRP (mg/l)	>50	88,2	36,4	31,9	90,2	1,39	0,32
	>100	82,3	53,6	37,5	90,0	1,77	0,33
	>150	64,7	71,3	42,9	85,6	2,25	0,49
	>200	37,2	80,8	39,6	79,2	1,94	0,77
IL6 (pg/ml)	>100	78,4	72,8	49,4	91,0	2,88	0,30
	>200	62,7	77,5	48,5	86,0	2,78	0,48
	>500	47,0	84,0	50,0	82,5	2,94	0,63
	>1000	43,0	90,0	59,5	82,4	4,30	0,23
Lactato (mmol/l)	>2,5	27,5	98,0	82,4	79,6	13,7	0,74
	>2,0	41,2	91,8	63,6	81,8	5,0	0,64
	> 1,5	52,9	77,6	45,0	82,6	2,4	0,61
	>1	88,2	46,3	36,3	91,9	1,6	0,25

Tabela 1b: Sensibilidade e especificidade de diferentes limites de exclusão de níveis de HBP no diagnóstico de sepsia bacteriana grave

<b>limite de exclusão de HBP (ng/ml)</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Sensibilidade</b>
>15	95,1	88,2
>16	98,0	88,2
> 17	98,6	84,3
>19	98,6	84,3
<b>&gt;20</b>	<b>99,3</b>	<b>82,4</b>
>21	99,3	80,4
>22	99,3	78,4
>23	99,3	76,5
>24	99,3	74,5

Tabela 1c: Sensibilidade e especificidade de diferentes limites de exclusão dos níveis de razão HBP/WBC no diagnóstico de sepsia bacteriana grave

<b>limite de exclusão da razão HBP/WBC</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Sensibilidade</b>
1,4	87,1	92,2
1,5	95,0	88,2
1,7	95,5	86,3
1,8	96,3	86,3
1,9	98,0	86,3
<b>2,0</b>	<b>98,6</b>	<b>86,3</b>
2,1	98,6	84,3
2,2	98,6	81,4
2,3	98,6	78,4
2,4	98,6	74,5
3,6	99,3	54,9

Tabela 2: Análise da curva ROC para variáveis testadas no diagnóstico de sepsia bacteriana grave

Variável(eis) do Resultado do Teste	Área Sob a Curva	Erro Padrão (a)	Sig. Assimptótica (b)	Intervalo de Confiança Assimptótico de 95%	
				limite inferior	limite superior
HBP (ng/ml)	0,954	0,017	0,000	0,920	0,988
razão HBP/WBC	0,949	0,022	0,000	0,905	0,993
razão HBP/WBC ou nível de HBP (ng/ml)	0,960	0,019	0,000	0,923	0,997
CRP (mg/ml)	0,719	0,040	0,000	0,641	0,797
IL6 (pg/ml)	0,789	0,038	0,000	0,714	0,863
Lactato (mmol/l)	0,769	0,050	0,000	0,697	0,841
Contagem de WBC	0,511	0,050	0,820	0,413	0,608

#### LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> HANSA MEDICAL AB  
 <120> MÉTODO DE DIAGNÓSTICO  
 <130> N101680A SER  
 <150> WBC 0711327.7  
 <151> 2007-06-12  
 <160> 1  
 <170> PatentIn version 3.0  
 <210> 1  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 1

```

Ile Val Gly Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg Gln Phe Pro Phe Leu Ala
1      5      10      15
Ser Ile Gln Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His
20      25      30
Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Gln Ser Gln Asn Pro
35      40      45
Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu
50      55      60
Arg Gln Ser Arg Gln Thr Phe Ser Ile Ser Ser Met Ser Glu Asn Gly
65      70      75      80
Tyr Asp Pro Gln Gln Asn Leu Asn Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Asp
85      90      95
Arg Glu Ala Asn Leu Thr Ser Ser Val Thr Ile Leu Pro Leu Pro Leu
100     105     110
Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala Gly Thr Arg Cys Gln Val Ala Gly Trp
115     120     125
Gly Ser Gln Arg Ser Gly Gly Arg Leu Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val
130     135     140
Asn Val Thr Val Thr Pro Glu Asp Gln Cys Arg Pro Asn Asn Val Cys
145     150     155     160
Thr Gly Val Leu Thr Arg Arg Gly Gly Ile Cys Asn Gly Asp Gly Gly
165     170     175

Thr Pro Leu Val Cys Glu Gly Leu Ala His Gly Val Ala Ser Phe Ser
180     185     190
Leu Gly Pro Cys Gly Arg Gly Pro Asp Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu
195     200     205
Phe Arg Asp Trp Ile Asp Gly Val Leu Asn Asn Pro Gly Pro
210     215     220

```

Lisboa, 2012-05-31

REIVINDICAÇÕES

1. Método de identificação se um indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave, método este que compreende a medição da proteína de ligação a heparina (HBP) numa amostra de fluido colhida do indivíduo e desse modo a determinação se o indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda a medição da contagem de glóbulos brancos do sangue (WBC) ou da contagem de neutrófilos (CN) numa amostra de sangue colhida do indivíduo, o cálculo da razão HBP/WBC ou da razão HBP/CN, respectivamente, e desse modo a determinação se o indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a determinação se o indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave compreende a determinação se a concentração de HBP é ou não superior a 15 ng/ml ou 20 ng/ml na amostra de fluido.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o nível ou concentração de HBP na amostra de fluido está aumentado em pelo menos 2,5 vezes relativamente ao nível ou concentração de HBP na linha de base.

5. Método de acordo com a reivindicação 2, em que, quando a concentração de HBP na amostra de fluido é medida em ng/ml e os WBC na amostra de sangue são medidos em número de células  $\times 10^9/L$ , a determinação se o indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave compreende a determinação se a razão HBP/WBC é ou não superior a 2.

6. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a razão HBP/WBC ou a razão HBP/CN na amostra de sangue está aumentada em pelo menos 2,5 vezes relativamente à razão HBP/WBC ou à razão HBP/CN na linha de base, respectivamente.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o indivíduo é suspeito de estar em risco de desenvolver sepsia grave.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o indivíduo possui uma infecção confirmada ou suspeita e/ou apresenta um ou mais dos critérios de Síndrome de Resposta Inflamatória Grave (SIRS).

9. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o indivíduo possui uma infecção confirmada ou suspeita e/ou apresenta dois ou mais dos critérios de SIRS.

10. Método de acordo com a reivindicação 8 ou 9, em que a infecção confirmada ou suspeita afecta: os pulmões; o tracto respiratório; o fígado; os rins; o tracto urinário; a pele (cutânea e subcutânea); o coração; o estômago; os intestinos; o sangue; os ossos; as articulações ou quaisquer suas combinações.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10 em que o indivíduo é: imunocomprometido; um diabético; um paciente hospitalizado com uma linha intravenosa, uma ferida cirúrgica, um dreno cirúrgico ou uma úlcera de pressão; ou quaisquer suas combinações.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que o indivíduo é um mamífero.

13. Método da reivindicação 12 em que o mamífero é um ser humano.

14. Utilização *in vitro* de um anticorpo específico para HBP, ou de um seu fragmento capaz de se ligar a HBP, para a determinação se um indivíduo está ou não em risco de desenvolver sepsia grave.

Lisboa, 2012-05-31

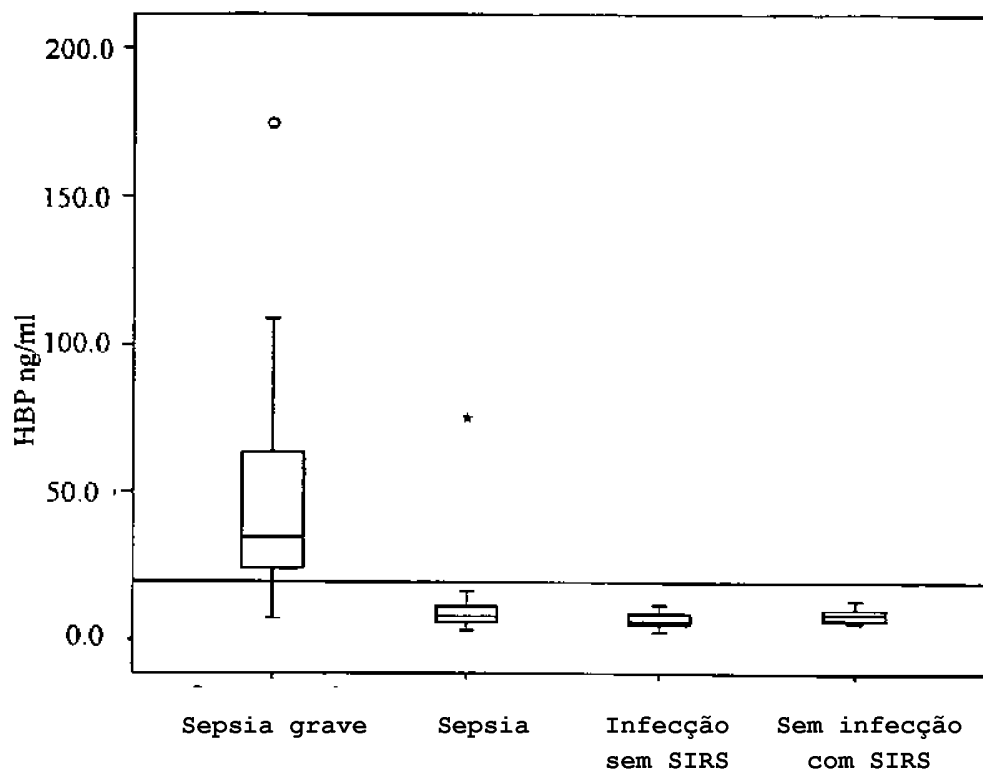
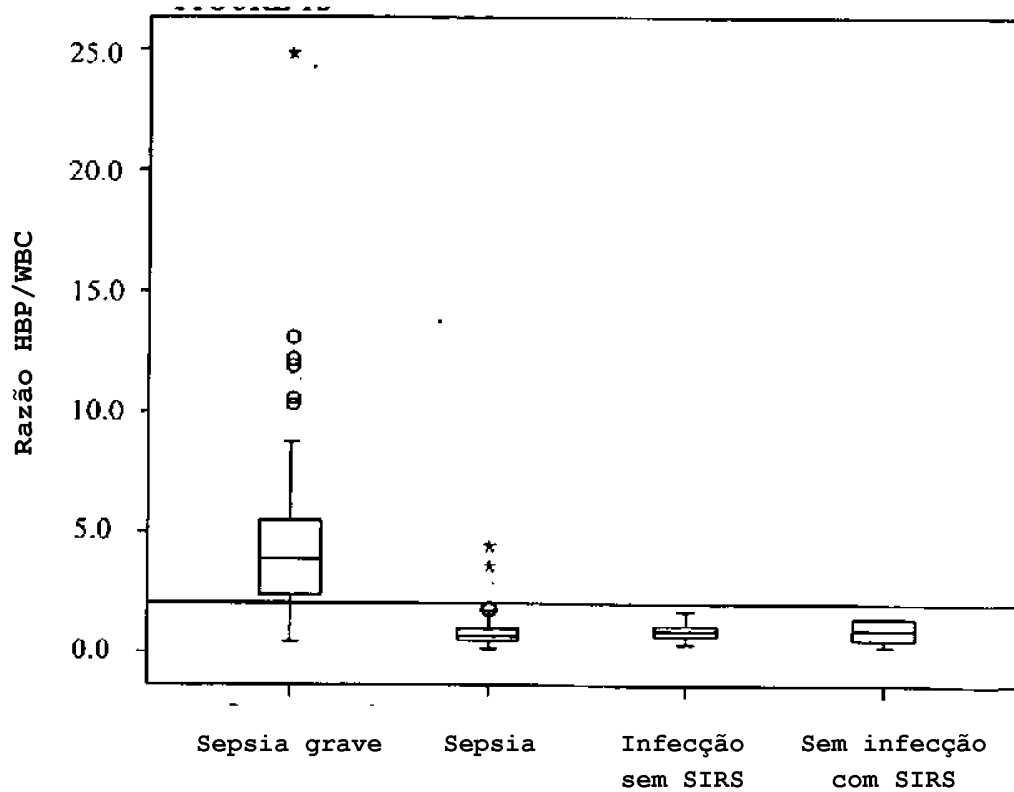
**FIGURA 1a****FIGURA 1b**

FIGURA 1c

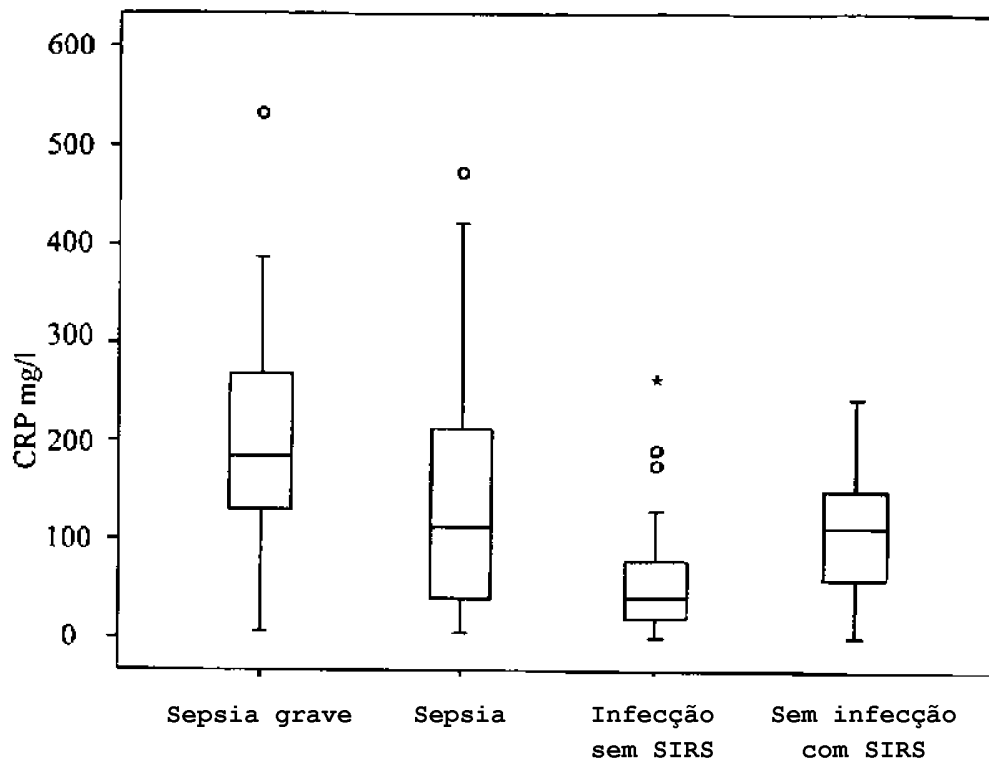


FIGURA 1d

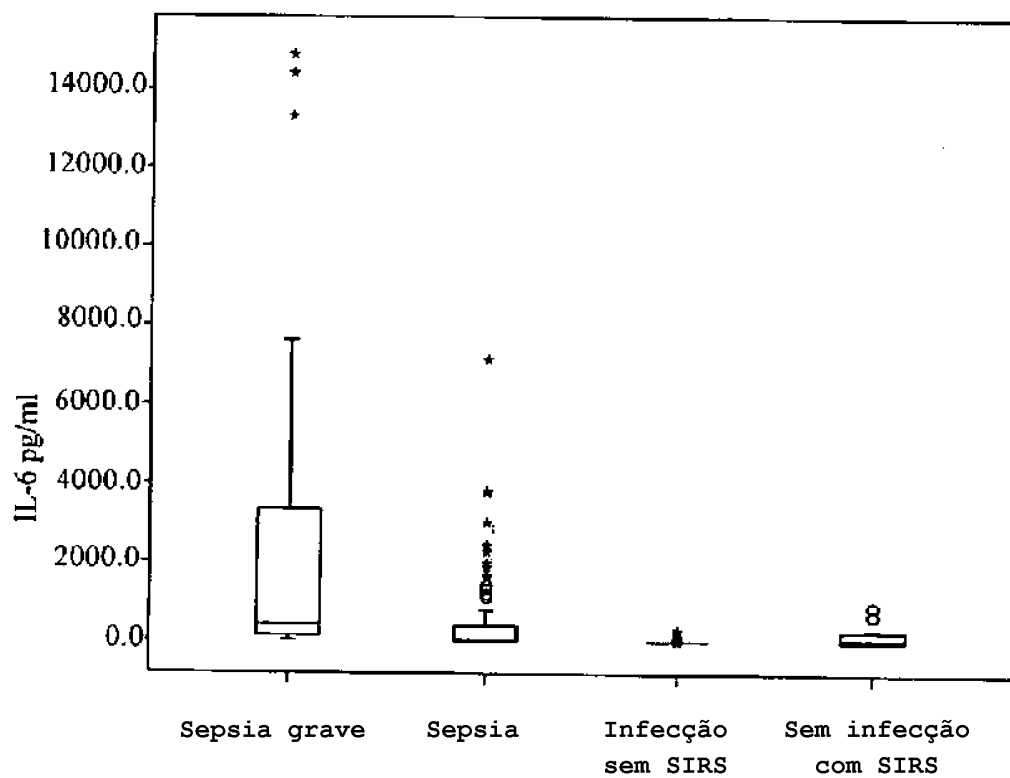




FIGURA 1e

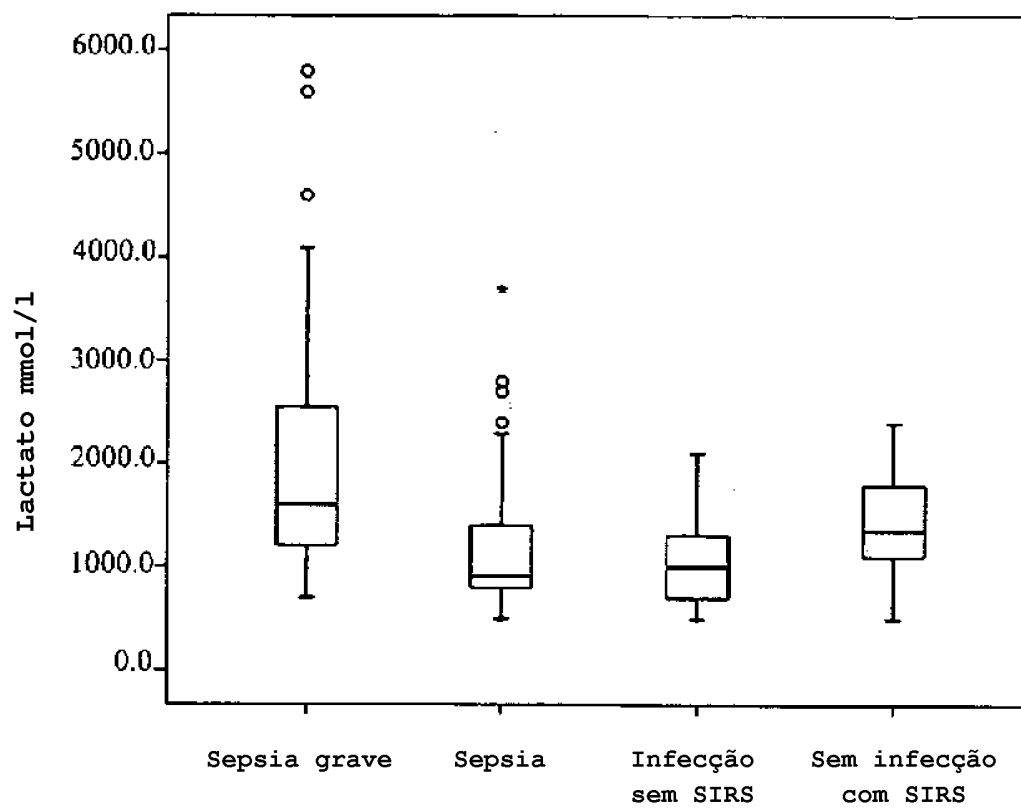


Figura 2

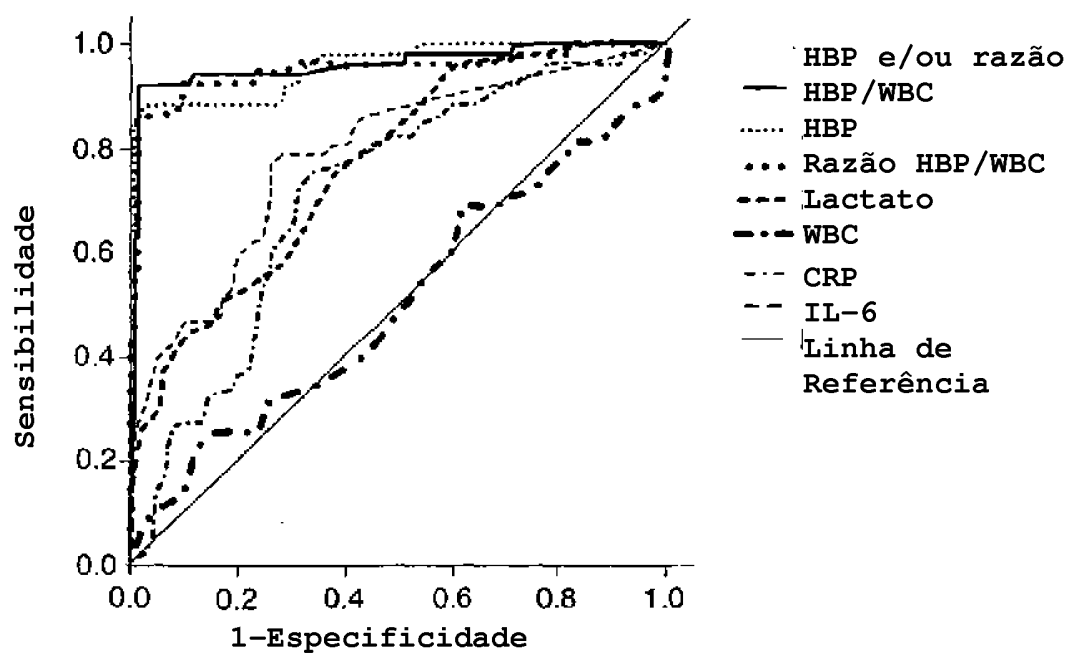


Figura 3a

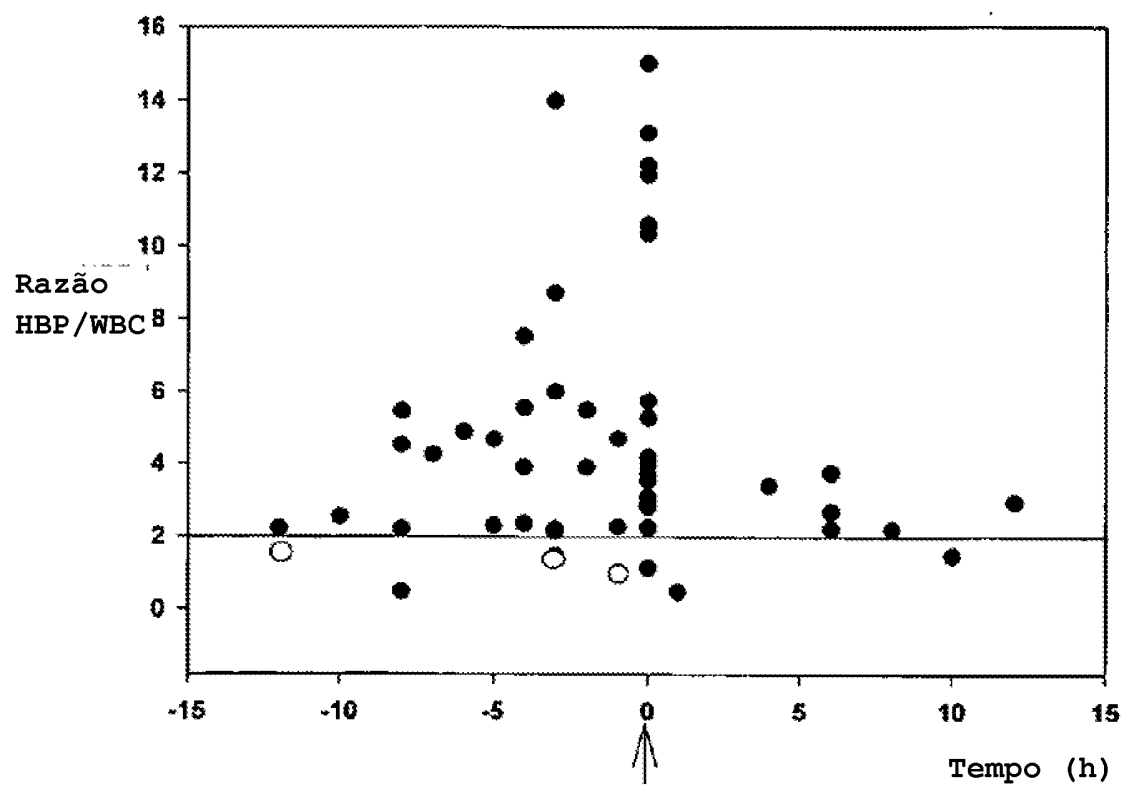
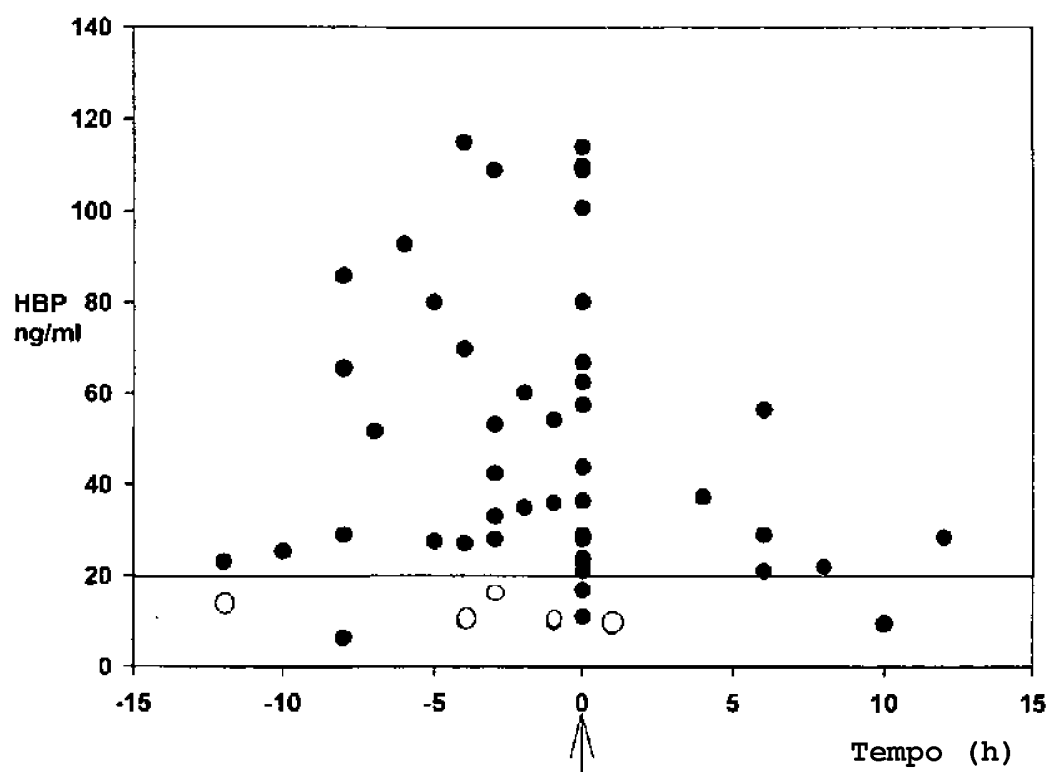


FIGURA 3b



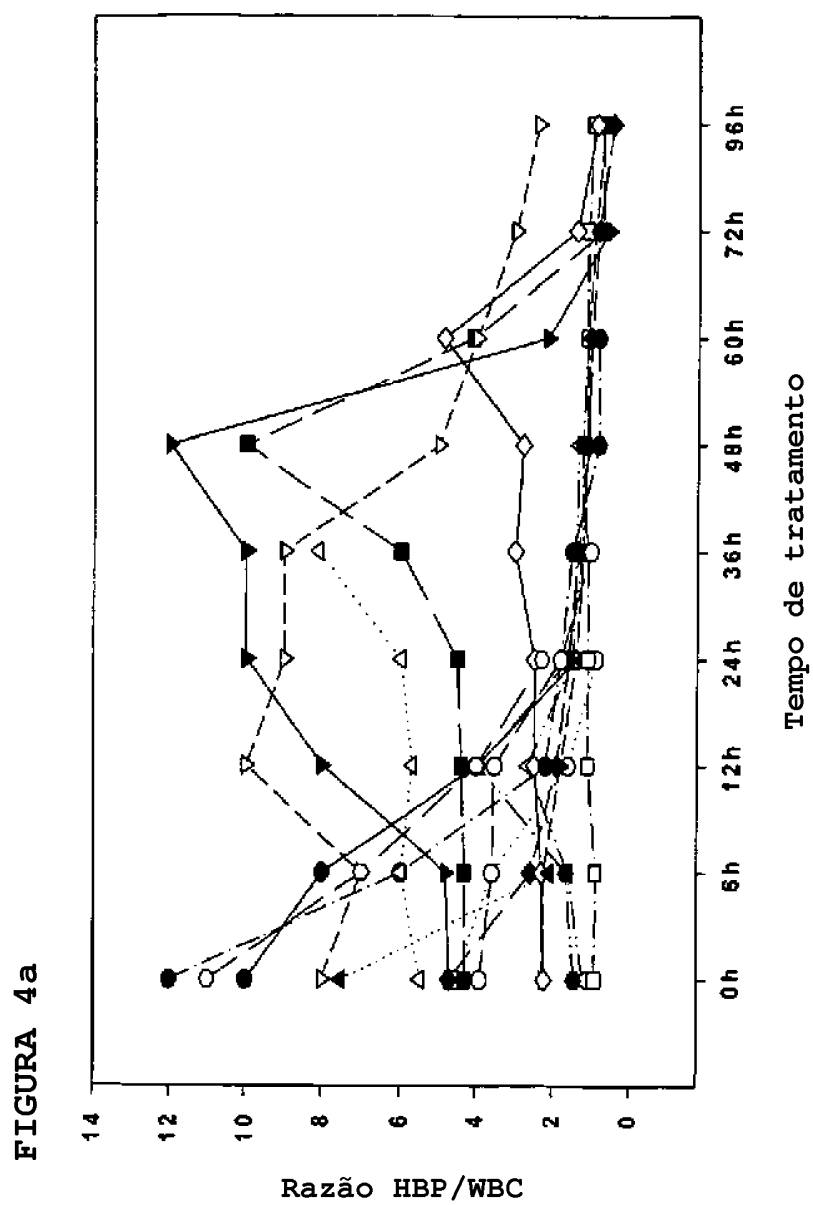


FIGURA 4b

