



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00786

(22) Data de depozit: 26/11/2020

(41) Data publicării cererii:
30/05/2022 BOPI nr. 5/2022

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE DIN CRAIOVA,
STR. PETRU RAREȘ NR. 2, CRAIOVA, DJ,
RO

(72) Inventatori:
• NETEA MIHAI GHEORGHE,
STR.HOEFSLAG, NR.27, 6525PA,
NIJMEGEN, NL;
• MIHAI IOANA,
STR.CONSTANTIN ANGELESCU, NR.6,
BL.S62, SC.1, AP.3, CRAIOVA, DJ, RO;

• COSTACHE ANCA LELIA, STR.OVIDIU,
NR.10, CRAIOVA, DJ, RO;
• DUMITRESCU FLORENTINA,
STR.MAREȘAL AVERESCU, NR.13,
BL.D19, SC.2, AP.16, CRAIOVA, DJ, RO;
• PÎRVU ANDREI, STR.ELENA FARAGO,
NR.47, BL.171G, SC.1, ET.3, AP.13,
CRAIOVA, DJ, RO;
• STREATA IOANA, BD.DACIA, NR.66,
BL.T7, SC.2, AP.13, CRAIOVA, DJ, RO;
• CUCU MIHAI-GABRIEL,
STR.G-RAL DRAGALINA, NR.78, CRAIOVA,
DJ, RO;
• PLEȘEA RĂZVAN MIHAIL,
STR.MATEI MILLO NR.2, CRAIOVA, DJ, RO

(54) METODĂ INOVATIVĂ DE DISCRIMINARE A RISCULUI
DE SEPSIS PE BAZA UNOR MARKERI PROTEOMICI

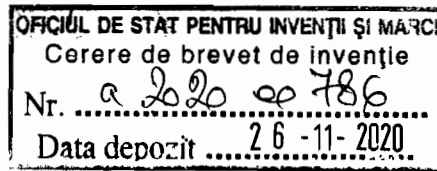
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de identificare precoce a riscului de sepsis cu aplicabilitate în stratificarea pacienților cu factori de risc monitorizați. Metoda, conform invenției, constă în utilizarea unui set de 3 proteine și evaluarea combinată a nivelurilor plasmaticice ale moleculelor TNFSF14, OSM și TRANCE implicate în inflamație, care sunt completate cu statusul, semnele și

simptomele clinice, precum și cu alți markeri biochimici, astfel că un profil de sepsis este cel în care TNFSF14 și OSM au valori crescute, iar TRANCE are valori scăzute.

Revendicări: 1
Figuri: 1





METODĂ INOVATIVĂ DE DISCRIMINARE A RISCULUI DE SEPSIS PE BAZA UNOR MARKERI PROTEOMICI

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la o metodă de discriminare a riscului de sepsis prin evidențierea statusului inflamator identificat prin nivel crescut/scăzut al unui set de proteine, cu aplicabilitate în stratificarea pacienților pe baza unor teste de proteomică care determină nivelul circulator al acestora din sânge, ca metodă de asistare în luarea deciziei medicale: identificarea riscului, monitorizare, intervenție promptă.

Prezentarea domeniului tehnic.

Sepsisul este definit ca răspuns inflamator sistemic dereglat al organismului ca rezultat al infecțiilor severe, ce poate conduce la disfuncții de organ, iar în cazuri grave moartea. Incidența estimată a sepsisului în anul 2017 a fost de 48,9 milioane cu 11 milioane de decese legate de sepsis (Blanco et al., 2008; Gaieski, Edwards, Kallan, & Carr, 2013; Rudd et al., 2020). În lumea dezvoltată sepsisul este cea mai frecventă cauză de deces în unitățile de terapie intensivă non-coronariene (Anestezie Terapie Intensivă) cu o rată de fatalitate între 15-40% în funcție de agentul etiologic; în zonele cu resurse medicale limitate mortalitatea este mult mai mare ("The outcome of patients with sepsis and septic shock presenting to emergency departments in Australia and New Zealand," 2007; Sakr et al., 2018). Date similare se pot extrapola și pentru România, dar din câte cunoaștem, nu există studii sau rapoarte exhaustive privind epidemiologia sepsisului în țara noastră. Este de așteptat că sepsisul va rămâne o importantă problemă clinică în viitor, exacerbată de o combinație de factori ce includ îmbătrânirea populației, terapii agresive pentru boli cronice sau afecțiuni maligne, și în rezistența la antibiotice în curs de dezvoltare.

Ca atare, în sepsis există o nevoie clinică încă neîntâmpinată de diagnostic eficient cât mai precoce și intervenții terapeutice țintite și eficiente introduse în timpuri optime.

Prezentarea stadiului tehnicii.

Mecanismele implicate în fiziopatologia sepsisului încă sunt incomplet elucidate. Modelul inițial, cel al unei copleșitoare reacții inflamatorii nu a reușit să redea fiziopatologia complexă a

sindromului, fapt dovedit prin o multitudine de studii clinice, cu o varietate de agenți anti-inflamatorii, care au eșuat (Rubio et al., 2019).

Sepsisul este datorat activării mecanismelor sistemului imun prin intermediul receptorilor de recunoaștere a patternurilor (PRRs) de către patternuri moleculare asociate patogenilor (PAMPs). Activarea PRR activează la rândul ei factori de transcripție ca NF-κB, proteina activatoare 1, factorul reglator al interferonului (IRF) (H. Kumar, Kawai, & Akira, 2011). Există mai multe subgrupuri PRRs, care includ Toll-like receptors (TLRs) și C-lectin receptors (CLR), importante în apărarea împotriva bacteriilor și fungilor și receptori din citoplasmă (RLRs) cu rol în infecțiile virale.

În secvența evenimentelor, răspunsul imun care urmează activării este reglat de o rețea complexă. Pe lângă producția de citokine, o serie de mediatori inflamatori sunt eliberați, sistemul coagulării și sistemul complement sunt activate (H. Kumar et al., 2011), hepatocitele, sub influența citokinelor pro-inflamatorii, în special IL-6, produc proteine de fază acută, iar endoteliul și adipocitele contribuie și ele prin sinteza și eliberarea anumitor factori.

În general, rezoluția infecției înseamnă și revenirea la homeostazie. Însă, în cazul unora dintre infecții, reacții pro-inflamatorii, orientate către eliminarea patogenilor, sunt responsabile pentru daune "colaterale" - "furtuna citokinică". Suprimarea sistemului imunitar, supresie denumită "immunoparalizie", care însoțește fazele mai avansate ale sepsisului, contribuie decisiv la letalitate (van der Poll, van de Veerdonk, Scicluna, & Netea, 2018). Această schimbare de paradigmă, prin înțelegerea fenomenului ca fiind unul bifazic, a deschis calea unei noi strategii terapeutice (S. C. Cheng et al., 2016). În timp ce inabilitatea de a genera răspunsuri de eficiente apărare este o trăsătură importantă a immunoparaliziei în sepsis, mecanismele care stau la baza acesteia sunt incomplet înțelese (Hamers, Kox, & Pickkers, 2015).

Sepsisul este un sindrom heterogen. Prognosticul sepsis - ului este în general rezervat, acesta depinde de mulți factori care se pot asocia. Amintim dintre factorii de risc: sexul masculin, rasa, vârsta, comorbidități asociate, abuzul de alcool și apartenența la clase sociale cu nivel socioeconomic scăzut. De asemenea au fost identificate variații sezoniere, sepsisul fiind mai frecvent diagnosticat în lunile de iarnă.

Identificarea agentului cauzal al infecției sistemice este de o importanță majoră pentru succesul terapiei. Orice agent patogen este susceptibil de a declanșa sepsisul, însă, în practică, sepsisul este cel mai frecvent întâlnit în urma unei infecții bacteriene. Bacteriile implicate în

aparitia sepsisului pot fi gram - pozitive sau gram - negative, aerobe, facultativ aerobe sau anaerobe (Grondman, Pirvu, Riza, Ioana, & Netea, 2020; Vincent et al., 2006) .

Se recomandă ca în momentul diagnosticării șocului septic sau a suspiciunii de infecție sistemică să se recurgă la recoltarea probelor biologice necesare pentru izolarea și identificarea agentului etiologic. Testarea bacteriologică este în acest moment standard de aur, dar vine cu dezavantaje legate de timpi mari de execuție, posibilitatea unui test neconcludent, chiar și după prelevări seriate. Prelevările se recomandă a fi efectuate în prima oră de la stabilirea diagnosticului și înainte de inițierea administrării antibioterapiei, care de multe ori este fie deja inițiată comunitar, ca automedicație, fie este necesară și se impune inițierea promptă în timpul spitalizării. Iată deci presiunea timpului în luarea unor decizii medicale.

Alte tehnici moderne de diagnostic, biomarkerii pot avea un rol important în a evidenția prezența, absența sau severitatea sepsisului și pot diferenția o infecție bacteriană de infecții virale sau fungice; în plus poate ajuta la diagnosticul diferențial dintre sepsis (infecție sistemică) și infecții locale (Marshall & Reinhart, 2009).

Dintre proteinele de fază acută, proteina C reactivă (CRP) a fost utilizată pentru mulți ani ca biomarker, dar specificitatea sa în infecțiile sistemice și sepsis nu excelează (Brodska et al., 2013; ten Oever et al., 2012); nivelul seric al CRP crește în infecție, dar și în boli inflamatorii neinfecțioase (Schultz & Arnold, 1990).

Procalcitonina (PCT) a fost propusă ca fiind mai specifică și cu o valoare mai bună comparativ cu CRP ca marker de prognostic, deși valoarea ei diagnostică, este de asemenea nu suficient de specifică (Luzzani et al., 2003; Uzzan, Cohen, Nicolas, Cucherat, & Perret, 2006).

Presepsina (sCD14 - ST) – CD 14, este o glicoproteină exprimată pe suprafața membranei celulare a monocitelor și a macrofagelor, prezentă și în macrofage, monocite și granulocite, fiind responsabilă de transmiterea intracelulară a semnalului declanșat de prezența endotoxinelor. Frația sa solubilă, numită subtipul CD14 solubil, sau presepsină, are valori plasmatiche crescute în infecții (Masson et al., 2015).

Feritina este una dintre proteinele - marker nespecific de inflamație, ale cărei nivele plasmatiche înalte se corelează foarte bine cu severitate inflamației și riscul de mortalitate (Carcillo et al., 2017; Garcia et al., 2007).

În prezent, mai mult de 175 de biomarkeri au fost studiați în sepsis, majoritatea fiind proteine, și fiind rezultatul analizei unui lot în general mic de pacienți. (Pierrakos & Vincent,

2010). Rămâne de pus în perspectivă utilitatea clinică a folosirii lor în identificarea specifică a semnăturii proteomice/metabolomice a sepsisului.

Spre deosebire de alte boli majore, tratamentul pentru sepsis este relativ nespecific și limitat la antibiotice și terapie intensivă de suport în cazul disfuncției de organe. Nu există medicamente aprobate care în mod specific să țintească sepsisul. Rata de mortalitate în sepsis este în continuare ridicată, cu toate progresele terapeutice înregistrate recent.

Dezavantajele metodelor curente.

Metodele curente nu permit identificarea sepsisului în timp prompt pentru instituirea precoce a intervenției medicale, care se bazează pe decizia clinică, de multe ori înșelată de simptomatologia nespecifică a sepsisului. Diagnosticul etiopatogenic prin identificarea bacteriologică este de durată, cu reușită variabilă. Alternativa folosirii markerilor biochimici este în acest moment cu utilitate discutabilă în asistarea unei decizii terapeutice.

Prezentarea problemei tehnice.

Lipsa înțelegerii complete a mecanismelor imune implicate în sepsis se repercutează negativ asupra posibilităților de diagnostic precoce, intervenție și a obținerii unei rezoluții favorabile a cazului.

Factorii de risc implicați în dezvoltarea sepsisului precum și semnele și simptomele nu sunt suficient de specifici pentru a orienta clinicianul către diagnosticul de sepsis, sau a stratifica riscul de sepsis.

Metodele curente de stabilire a diagnosticului de sepsis nu au sensibilitate și specificitate suficientă pentru discriminarea promptă a acestui status, chiar și în situațiile în care clinicianul o suspectează.

Identificarea agentului patogen presupune că gândirea clinică a identificat sepsisul și infecția ca diagnostic prezumptiv; procedeul diagnostic bacteriologic durează până la zile până la un răspuns, care poate fi de multe ori neinformativ, și presupune de cele mai multe ori recoltare repetată a probelor pentru creșterea șanselor de diagnostic.

Întârzierea diagnosticului de sepsis se poate repercutea negativ asupra rezoluției cazului de sepsis prin neacordarea asistenței medicale necesare în timp optimi, sau acordarea unui sprijin medical neadecvat situației/gravității cazului.

Este deci nevoie presantă de unelte pentru stratificarea riscului și identificarea precoce a sepsisului; acestea sunt cheia intervenției optime în combaterea sepsisului (A. C. Cheng, West, Limmathurotsakul, & Peacock, 2008).

Expunerea invenției.

Invenția se referă la o metodă de discriminare a riscului de sepsis prin evidențierea statusului inflamator identificat prin nivel crescut/scăzut al unui set de proteine, cu aplicabilitate în stratificarea pacienților pe baza unor teste de proteomică care determină nivelul circulator al acestora din sânge, ca metodă de asistare în luarea deciziei medicale: identificarea riscului, monitorizare, intervenție promptă.

Propunem folosirea unui set de 3 proteine al căror nivel relativ (măsurat prin tehnici ca O-link), sau nivelul absolut este semnificativ modificat în sepsis. În figura 1, date O-link generate de grupul nostru de cercetare arată corelații înalt semnificative statistice ale proteinelor TNFSF14, OSM, TRANCE la pacienții cu sepsis, față de subiecți sănătoși.

Implicarea acestor molecule în sepsis are plauzabilitate biologică:

-TNFSF14 (abreviere a "tumor necrosis factor receptor superfamilies" sau LIGHT) joacă un rol cheie în răspunsul imun sistem, în principal în supraviețuirea pe termen lung a celulelor Th1 și Th2 de memorie (Croft et al., 2012). Studii de transcriptomică au identificat nivelul de transcripție al TNFSF14 alături de alte gene ca fiind relevant pentru sepsisul fungic (Zheng et al., 2020).

-OSM (abreviere a "Oncostatin M") este o citokină pleiotropă a familiei IL-6. Recent, un studiu arată potențialul ca marker prognostic sau țintă terapeutică (Gong et al., 2020). OSM acționează pe calea de semnalizare Jak/Stat, una dintre căile principale de semnalizare folosite de citokine, cu importanță deosebită în sepsis prin implicarea în soc septic, disfuncție de organ (Cai, Cai, Luo, Chen, & Zhang, 2015).

-TRANCE (abreviere a "TNF-related activation-induced cytokine") este o proteină ligand al familiei de receptori ai factorului de necroză tumorală (TNF), mediator pro-inflamator indus în principal de endotoxine (V. Kumar, 2018). Este sintetizat predominant de celule T și are rol pro-supraviețuire pentru celulele dendritice (DC), prin inhibarea apoptozei lor, activitate in vivo dovedită și de un trial de folosire ca adjuvant (Josien et al., 2000). S-a speculat rolul important al celulelor dendritice în menținerea homeostaziei imune. Susținerea de către aceste celule a unui

răspuns Th1/Th2 (Wang et al., 2020) aberant explică implicarea acestor celule în sepsis, în imunosupresia asociată cu sepsisul, în disfuncția de organ (V. Kumar, 2018).

Deși mecanismele biologice, indicate succint mai sus, explică implicarea acestor trei molecule în sepsis, din câte cunoaștem, până în acest moment, nivelul acestor proteine nu a fost folosit cu rol diagnostic/prognostic pentru sepsis. Așa cum arătam anterior, una din problemele prioritare în managementului cazului de sepsis este identificarea unor biomarkeri utili în evaluarea statusului inflamator și discriminarea riscului de sepsis, iar panelul propus răspunde acestei nevoi.

Prezentarea avantajelor invenției.

Invenția aduce următoarele avantaje:

- Metoda propusă este informativă cu privire la nivelul unor molecule importante pentru sepsis care sunt direct corelate cu riscul de sepsis;
- Metoda propusă este relativ ieftină și potențial ușor de implementat, presupunând dotări medii ale unui laborator de analize.
- Toate acestea fac din metoda pe care o propunem un instrument care poate contribui la stratificarea pacienților pentru riscul de sepsis pe baza acestui set de markeri proteomici și la ghidarea strategiei de îngrijire a pacientului de către medicii curanți.

Prezentarea a cel puțin unui mod de realizare a invenției.

Metoda propusă are utilitate în mediul medical cu servicii complexe disponibile. Evaluarea pacientului se bazează pe evaluarea combinată a nivelelor plasmatică/serice ale moleculelor TNFSF14, OSM, TRANCE, proteine implicate în inflamație, pentru a identifica riscul de inflamație/sepsis.

Nivelele acestor proteine completează tabloul dat de statusul, semnele și simptomele clinice, și trebuie coroborată cu alți markeri (ex biochimici) pentru a discrimina risc de sepsis da/nu.

Un exemplu de profil de sepsis este cel în care TNFSF14 și OSM au valori crescute, iar TRANCE are valori scăzute. Nivelul acestor proteine este fie unul relativ (asa cum măsoară tehnica O-link), fie unul absolut (tehnicile cantitative de laborator).

REVENDICĂRI

1. Metoda **METODĂ INVOATIVĂ DE DISCRIMINARE A RISCULUI DE SEPSIS PE BAZA UNOR MARKERI PROTEOMICI** se **caracterizată prin aceea că** se bazează pe evaluarea combinată a nivelelor plasmatice/serice ale moleculelor TNFSF14, OSM, TRANCE, proteine implicate în inflamație, pentru a identifica riscul de inflamație/sepsis. Evaluarea acestor proteine ține cont de statusul, semnele și simptomele clinice, este coroborată cu alți markeri (ex biochimici). Un exemplu de profil de sepsis este cel în care TNFSF14 și OSM au valori crescute, iar TRANCE are valori scăzute.

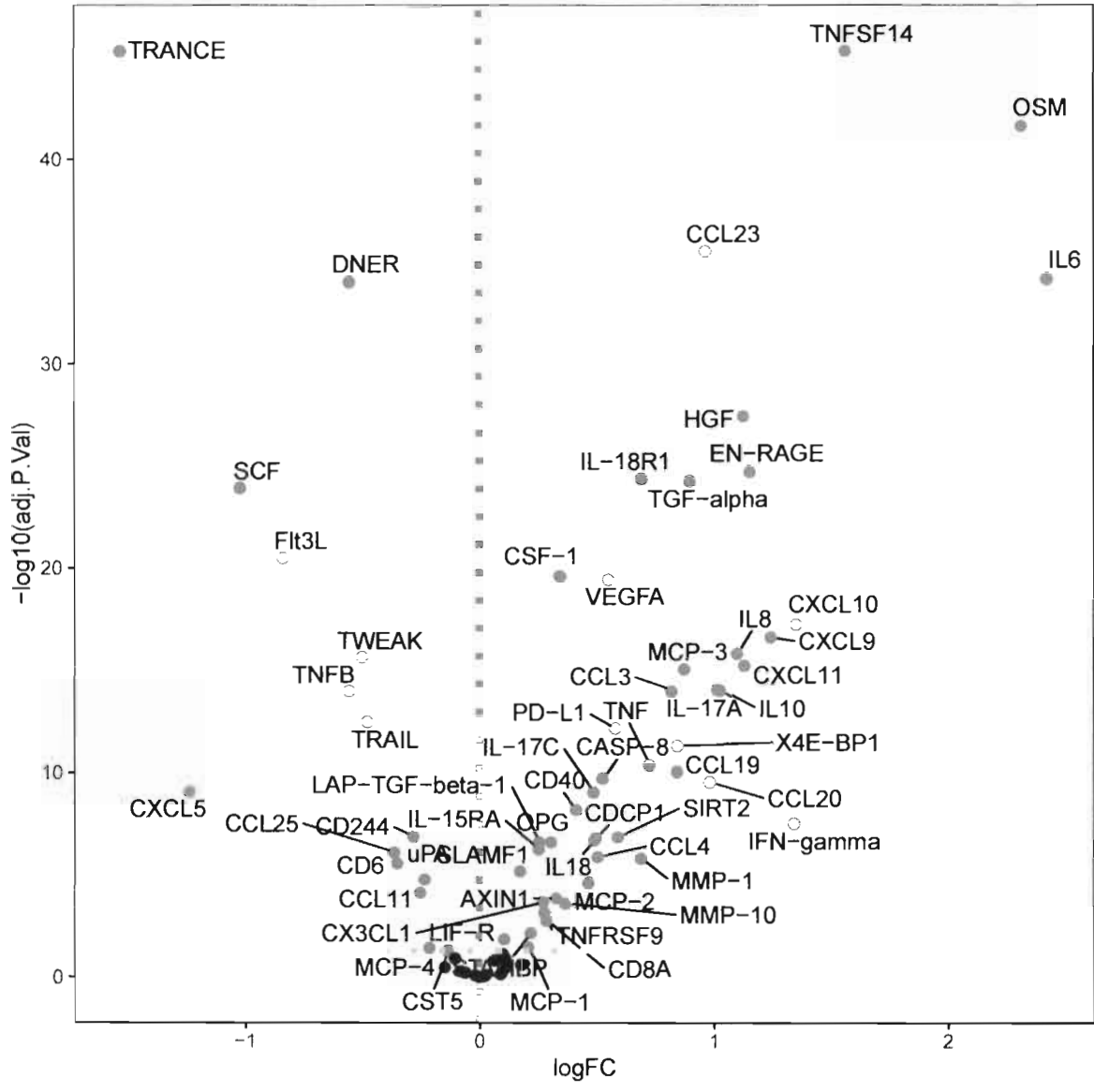


Figura 1