



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112016009827-7 B1**



**(22) Data do Depósito:** 06/11/2014

**(45) Data de Concessão:** 26/10/2021

**(54) Título:** MÉTODO IN VITRO PARA CONCENTRAR PATÓGENOS INFECCIOSOS PRESENTES EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA OBTIDA A PARTIR DE UM INDIVÍDUO SOB SUSPEITA DE ESTAR INFECTADO COM OS DITOS PATÓGENOS, CONCENTRADOR E KIT

**(51) Int.Cl.:** A61M 1/36.

**(30) Prioridade Unionista:** 08/11/2013 US 61/902,070.

**(73) Titular(es):** EXTHERA MEDICAL CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** ROBERT S. WARD; KEITH R. MCCREA.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2014064419 de 06/11/2014

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/069942 de 14/05/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 02/05/2016

**(57) Resumo:** MÉTODO IN VITRO PARA CONCENTRAR PATÓGENOS INFECCIOSOS PRESENTES EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA OBTIDA A PARTIR DE UM INDIVÍDUO SOB SUSPEITA DE ESTAR INFECTADO COM OS DITOS PATÓGENOS, CONCENTRADOR E KIT. A presente invenção refere-se a um método in vitro para concentrar patógenos infecciosos encontrados em uma amostra biológica obtida a partir de um indivíduo sob suspeita de estar infectado com os patógenos. É também fornecido no presente documento um método in vitro para reduzir ou eliminar células sanguíneas de uma amostra obtida a partir de um indivíduo sob suspeita de estar infectado com um patógeno infeccioso. A presente invenção também fornece um método para diagnosticar malária e um método para determinar se um indivíduo está infectado com um patógeno. É também fornecido no presente documento um concentrador e um kit para uso com os métodos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO *IN VITRO* PARA CONCENTRAR PATÓGENOS INFECCIOSOS PRESENTES EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA OBTIDA A PARTIR DE UM INDIVÍDUO SOB SUSPEITA DE ESTAR INFECTADO COM OS DITOS PATÓGENOS, CONCENTRADOR E KIT"**.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[001] Este pedido reivindica a prioridade sobre o Pedido Provisório nº US 61/902,070, depositado em 8 de novembro de 2013, cuja descrição é incorporada ao presente documento em sua totalidade a título de referência para todos os propósitos.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[002] A detecção precoce de doenças infecciosas é necessária para controlar sua difusão, para direcionar a terapia e para aprimorar os resultados do paciente. Por exemplo, a identificação precoce e precisa de surtos de patógenos fatais pode impedir a ocorrência de pandemias globais. Atualmente, muitos métodos diagnósticos para infecções na corrente sanguínea causadas por, por exemplo, vírus (incluindo Ebola e filovírus relacionados) ou bactérias resistentes a fármaco, exigem pelo menos 24 ou mais para execução. Há uma necessidade na técnica de um método para minimizar o tempo necessário para detectar a presença de um patógeno em uma amostra de um indivíduo. O objetivo é detectar o patógeno enquanto ainda está presente em concentrações muito baixas, se possível, antes de sintomas clínicos estarem evidentes. A intervenção precoce pode, então, minimizar a intensidade e a duração da infecção, reduzindo, assim, a morbidade e a mortalidade.

[003] Em alguns casos, a presença de células, tais como células sanguíneas (por exemplo, glóbulos vermelhos e glóbulos brancos) na amostra reduz a especificidade e a sensibilidade do método de ensaio. Atualmente, não existem meio para isolamento e coleta rápidos de um

patógeno infeccioso de uma amostra biológica de modo que o patógeno possa ser identificado ou analisado quando presente em concentração muito baixa. Adicionalmente, há uma necessidade na técnica de tecnologias que possam aprimorar a sensibilidade dos métodos diagnósticos existentes para detectar patógenos. A presente invenção satisfaz essas e outras necessidades.

### **BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[004] Em um aspecto, a presente invenção fornece um método *in vitro* para concentrar uma ampla gama de patógenos infecciosos e toxinas presentes em uma amostra biológica obtida a partir de um indivíduo sob suspeita de estar infectado com os ditos patógenos. O método compreende: (a) colocar a amostra biológica obtida a partir do indivíduo em contato com um meio de adsorção de espectro amplo sob condições que formam um complexo aderente que compreende o meio de adsorção e os ditos patógenos; (b) separar o complexo aderente de componentes da amostra que não estão incluídos no complexo, mantendo, ao mesmo tempo, o complexo, por exemplo, lavando-se o complexo aderente com uma solução de tampão; e (d) coletar os patógenos do complexo aderente aplicando-se um tampão de eluição ao complexo, concentrando, assim, os patógenos infecciosos em um eluente. Em algumas modalidades, o método compreende, ainda, detectar os patógenos infecciosos isolados. Em alguns casos, detectar os patógenos infecciosos isolados compreende um ensaio colorimétrico, um imunoenensaio, um ensaio de imunossorvente ligado a enzima (ELISA), um ensaio baseado em PCR, um ensaio de proliferação de patógeno com manchamento opcional ou uma combinação dos mesmos.

[005] Em algumas modalidades, o tampão de lavagem é uma solução salina normal. Em algumas modalidades, o tampão de eluição é uma solução salina de alta força iônica ou hipertônica.

[006] Em algumas modalidades, a amostra biológica é seleciona-

da a partir do grupo que consiste em sangue total, soro, plasma, urina, fezes, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavagem bronquial, outro fluido corporal e combinações dos mesmos.

[007] Em algumas modalidades, o meio de adsorção é um substrato sólido de alta área superficial que tem pelo menos um adsorvente molecular de polissacarídeo na superfície do mesmo. Em algumas modalidades, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo está ligado à superfície do substrato sólido por ligação de ponto de extremidade. Em algumas modalidades, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo é um membro selecionado a partir do grupo que consiste em heparina, sulfato de heparano, manose, sulfato de dextrano, ácido hialurônico, ácido salicílico, quitosano e uma combinação dos mesmos. Em alguns instantes, a manose é D-manose ou um polímero de D-manose. Em alguns casos, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo é heparina e manose.

[008] Em algumas modalidades, o substrato sólido compreende uma pluralidade de microesferas de polímero rígido. A pluralidade de microesferas de polímero rígido pode ser de microesferas de polietileno rígido.

[009] Em algumas modalidades, os patógenos são selecionados a partir do grupo que consiste em *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, vírus Ebola (EBOV), filovírus não EBOV, Flaviviridae, *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, bactérias *enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (CRE), um patógeno produtor de ESBL, bactérias *enterococci* resistentes à vancomicina (VRE), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, citomegalovírus (CMV), Adenovírus, vírus do herpes simples 1 (HSV1), vírus do herpes simples 2 (HSV2) e qualquer combinação dos mesmos.



[0010] Em um segundo aspecto, a presente invenção fornece um método *in vitro* para reduzir ou eliminar células sanguíneas de uma amostra biológica obtida a partir de um indivíduo sob suspeita de estar infectado com um patógeno. O método compreende: (a) colocar a amostra biológica obtida a partir do indivíduo em contato com, opcionalmente, um meio de adsorção de espectro amplo sob condições para formar um complexo aderente que compreende o meio de adsorção e um patógeno presente na amostra; e (b) separar as células sanguíneas da amostra e do complexo aderente mantendo, ao mesmo tempo, o complexo aderente, reduzindo ou eliminando, assim, as células sanguíneas da amostra. Em algumas modalidades, a etapa (b) compreende, ainda, lavar o complexo aderente com uma solução salina. Em algumas modalidades, o método compreende, ainda, (c) aplicar um tampão de eluição ao complexo aderente; e (d) coletar o patógeno do complexo aderente. Em algumas modalidades, o método compreende, ainda, detectar os patógenos infecciosos isolados. Em alguns casos, detectar os patógenos infecciosos isolados compreende um ensaio colorimétrico, um imunoensaio, um ensaio de imunossorvente ligado a enzima (ELISA), um ensaio baseado em PCR, um ensaio de proliferação de patógeno ou uma combinação dos mesmos.

[0011] Em algumas modalidades, o tampão de lavagem é uma solução salina. Em algumas modalidades, o tampão de eluição é uma solução salina altamente iônica ou hipertônica.

[0012] Em algumas modalidades, a amostra biológica é selecionada a partir do grupo que consiste em sangue total, soro, plasma, urina, fezes, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavagem bronquial, outro fluido corporal e combinações dos mesmos.

[0013] Em algumas modalidades, o meio de adsorção é um substrato sólido de alta área superficial que tem pelo menos um adsorvente de polissacarídeo na superfície do mesmo. Em algumas modalidades,

o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo está ligado à superfície do substrato sólido por ligação de ponto de extremidade. Em algumas modalidades, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo é um membro selecionado a partir do grupo que consiste em heparina, sulfato de heparano, manose, sulfato de dextrano, ácido hialurônico, ácido salicílico, quitosano e uma combinação dos mesmos. Em alguns instantes, a manose é D-manose ou um polímero de D-manose. Em alguns casos, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo é heparina e manose.

[0014] Em algumas modalidades, o substrato sólido compreende uma pluralidade de microesferas de polímero rígido. A pluralidade de microesferas de polímero rígido pode ser de microesferas de polietileno rígido.

[0015] Em algumas modalidades, os patógenos são selecionados a partir do grupo que consiste em *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, vírus Ebola (EBOV), *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, bactérias *enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (CRE), um patógeno produtor de ESBL, bactérias *enterococci* resistentes à vancomicina (VRE), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, citomegalovírus (CMV), vírus do herpes simples 1 (HSV1), vírus do herpes simples 2 (HSV2) e qualquer combinação dos mesmos.

[0016] Em um terceiro aspecto, a presente invenção fornece um método *in vitro* para diagnosticar malária em um indivíduo sob suspeita de estar infectado com *Plasmodium*. O método compreende (a) colocar uma amostra obtida a partir do dito indivíduo em contato com um meio de adsorção sob condições para formar um complexo aderente que compreende o meio de adsorção e uma célula presente na amostra que está infectada com *Plasmodium*; (b) determinar a presença do

complexo aderente detectando-se uma alteração física ao meio de adsorção; e (c) prever que o indivíduo tem malária com base na alteração física ao meio de adsorção em comparação a um meio de adsorção de referência que foi colocado em contato com um amostra de controle. Em algumas modalidades, o método compreende, ainda, gerar uma curva padrão da alteração física ao meio de referência que foi colocado em contato com a amostra de controle.

[0017] Em algumas modalidades, a amostra biológica é selecionada a partir do grupo que consiste em sangue total, soro, plasma, urina, fezes, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavagem bronquial, outro fluido corporal e combinações dos mesmos. Em alguns casos, a amostra é sangue total.

[0018] Em algumas modalidades, a amostra de controle é uma amostra de um indivíduo saudável. Em algumas modalidades, a amostra de controle é uma amostra de um indivíduo com malária.

[0019] Em algumas modalidades, a alteração física é a cor do meio de adsorção.

[0020] Em algumas modalidades, o meio de adsorção é um substrato sólido de alta área superficial que tem pelo menos um adsorvente de polissacarídeo na superfície do mesmo. Em algumas modalidades, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo está ligado à superfície do substrato sólido por ligação de ponto de extremidade. Em algumas modalidades, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo é um membro selecionado a partir do grupo que consiste em heparina, sulfato de heparano, manose, sulfato de dextrano, ácido hialurônico, ácido salicílico, quitosano e uma combinação dos mesmos. Em alguns instantes, a manose é D-manose ou um polímero de D-manose. Em alguns casos, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo é heparina e manose.

[0021] Em algumas modalidades, o substrato sólido compreende

uma pluralidade de microesferas de polímero rígido. A pluralidade de microesferas de polímero rígido pode ser de microesferas de polietileno rígido.

[0022] Em um terceiro aspecto, a presente invenção fornece um método *in vitro* para determinar se um indivíduo está infectado com um patógeno infeccioso. O método compreende (a) colocar uma amostra de sangue total obtida a partir do dito indivíduo em contato com um meio de adsorção para formar um complexo aderente que compreende o meio de adsorção e um patógeno presente na amostra; (b) determinar a presença do complexo aderente detectando-se uma alteração física ao meio de adsorção; e (c) prever que o indivíduo está infectado pelo patógeno infeccioso com base na alteração física ao meio de adsorção em comparação a um meio de adsorção de referência que foi colocado em contato com uma amostra de controle. Em algumas modalidades, o método compreende, ainda, gerar uma curva padrão da alteração física ao meio de referência que foi colocado em contato com a amostra de controle.

[0023] Em algumas modalidades, a amostra biológica é selecionada a partir do grupo que consiste em sangue total, soro, plasma, urina, fezes, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavagem bronquial, outro fluido corporal e combinações dos mesmos. Em alguns casos, a amostra é sangue total.

[0024] Em algumas modalidades, a amostra de controle é uma amostra de um indivíduo saudável. Em algumas modalidades, a amostra de controle é uma amostra de um indivíduo infectado com o patógeno infeccioso.

[0025] Em algumas modalidades, a alteração física é a cor do meio de adsorção.

[0026] Em algumas modalidades, o meio de adsorção é um substrato sólido de alta área superficial que tem pelo menos um adsorvente

de polissacarídeo na superfície do mesmo. Em algumas modalidades, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo está ligado à superfície do substrato sólido por ligação de ponto de extremidade. Em algumas modalidades, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo é um membro selecionado a partir do grupo que consiste em heparina, sulfato de heparano, manose, sulfato de dextrano, ácido hialurônico, ácido salicílico, quitosano e uma combinação dos mesmos. Em alguns instantes, a manose é D-manose ou um polímero de D-manose. Em alguns casos, o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo é heparina e manose.

[0027] Em algumas modalidades, o substrato sólido compreende uma pluralidade de microesferas de polímero rígido. A pluralidade de microesferas de polímero rígido pode ser de microesferas de polietileno rígido.

[0028] Em algumas modalidades, os patógenos são selecionados a partir do grupo que consiste em *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, vírus Ebola (EBOV), *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, bactérias *enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (CRE), um patógeno produtor de ESBL, bactérias *enterococci* resistentes à vancomicina (VRE), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, citomegalovírus (CMV), vírus do herpes simples 1 (HSV1), vírus do herpes simples 2 (HSV2) e qualquer combinação dos mesmos.

[0029] Esses e outros aspectos, objetivos e modalidades serão tornados aparentes durante a leitura com a descrição detalhada a seguir.

## **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[0030] A Figura 1 mostra uma modalidade de um concentrador da presente invenção.

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[0031] A presente invenção fornece métodos para detecção e diagnóstico de doença infecciosa. Vantajosamente, a presente invenção pode ser usada para isolar bactérias, vírus, citocinas e outros patógenos (por exemplo, parasitas) de uma amostra de paciente que pode ser usada na detecção precoce de uma infecção. Em outro aspecto da presente invenção, as células e outros não analitos que podem interferir no ensaio de detecção de analito podem ser removidos da amostra com o uso do meio de adsorção descrito no presente documento.

[0032] São também fornecidos no presente documento métodos de ensaio cromogênico simples para detectar pRBCs e *Plasmodium* em circulação a partir de uma amostra coletada de um indivíduo humano. O método pode ser usado também para monitorar a progressão de malária durante a iniciação e/ou a conclusão da terapia antimalária.

[0033] Revelou-se, de modo surpreendente, que a parasitemia em pRBCs pode ser detectada colocando-se o sangue infectado em contato com um polissacarídeo (por exemplo, heparina ou sulfato de heparano) que foi ligado de modo covalente a um meio de adsorção. Os parasitas e pRBCs tornam-se ligados no meio de adsorção e, por sua vez, alteram a cor do meio. Assim, uma alteração de cor visível indica que o indivíduo tem uma infecção por malária.

## **I. DEFINIÇÕES**

[0034] Conforme usado no presente documento, os seguintes termos têm os significados atribuídos aos mesmos a não ser que especificado de outro modo.

[0035] O termo "infecção por malária" refere-se a uma infecção causada pelos protozoários parasíticos do gênero *Plasmodium*, tal como, porém, sem limitação, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*.

[0036] O termo "meio de adsorção" refere-se a um material ao qual uma célula, um polipeptídeo, um polinucleotídeo, uma molécula

química, uma molécula biológica pode aderir à superfície.

[0037] O termo "complexo aderente" refere-se a um complexo de pelo menos duas moléculas em que a primeira molécula está fixada (por exemplo, ligada, acoplada ou aglutinada) à superfície de um substrato, e a segunda molécula está fixada à primeira molécula.

[0038] O termo "alteração de cor" refere-se a uma alteração de uma primeira cor para uma segunda cor. Se não houver nenhuma diferença detectável na primeira cor e na segunda cor, então, uma alteração de cor não é indicada.

[0039] O termo "espectro visível" refere-se à porção do espectro eletromagnético, por exemplo, cerca de 390 a 7.000 nm que pode ser detectada pelo olho humano. Luz no infravermelho próximo, infravermelho de comprimento de onda médio e espectros do comprimento de onda distante não são visíveis pelo olho humano.

[0040] O termo "controle saudável" refere-se a um indivíduo que não tem uma infecção. O termo "controle positivo" refere-se a um indivíduo com uma infecção causada pelo patógeno de interesse.

[0041] O termo "alta área superficial" refere-se à propriedade de ter uma razão grande entre área de superfície específica e volume.

[0042] O termo "adsorvente" refere-se a um substrato sólido com um composto químico, uma molécula biológica ou um material que está ligado (por exemplo, ligado, acoplado ou aglutinado) ao mesmo. Em determinados casos, o adsorvente é o próprio substrato sólido. Em uma modalidade, um adsorvente é uma resina polimérica com um polissacarídeo ligado ao mesmo.

[0043] O termo "microesfera de polímero rígido" refere-se a uma microesfera, um grânulo, um pélete, uma esfera, uma partícula, uma microcápsula, uma esfera, uma microesfera, uma nanoesfera, uma micropérola, uma nanopérola, uma micropartícula, uma nanopartícula e similares que feita de uma resina polimérica.

[0044] O termo "carboidrato" refere-se a uma molécula que contém átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio e usualmente com a fórmula empírica  $C_x(H_2O)_y$ , em que x e y são números diferentes. Os exemplos de carboidratos incluem monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos.

[0045] O termo "polissacarídeo" refere-se a uma molécula que compreende muitas unidades de monossacarídeo unidas juntas por ligações glicosídicas e que têm uma fórmula empírica de  $C_x(H_2O)_y$ , em que x está entre 200 a cerca de 3.000.

[0046] O termo "terapia antimalária" refere-se a um tratamento, tal como um agente farmacologicamente eficaz, destinado a aliviar ou remediar uma infecção por malária.

## **II. DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES**

### **A. MEIO DE ADSORÇÃO**

[0047] O meio de adsorção da presente invenção fornece uma superfície para fixar um adsorvente de polissacarídeo que pode se ligar a analitos/patógenos e pRBCs. Em algumas modalidades, o meio de adsorção inclui um substrato sólido com uma alta área superficial que tem pelo menos um adsorvente de polissacarídeo na superfície do mesmo. O substrato sólido pode ser produzido a partir de, por exemplo, porém, sem limitação, polietileno, poliestireno, polipropileno, polisulfona, poliacrilonitrila, policarbonato, poliuretano, sílica, látex, vidro, celulose, acetato de celulose, dextrano reticulado, agarose reticulada, quitina, quitosano, dextrano reticulado, alginato reticulado, silicone, Teflon®, fluoropolímero e outros polímeros sintéticos. O substrato sólido com uma alta área superficial pode ser uma pluralidade de monocamadas adsorventes, filtros, membranas, fibras sólidas, fibras cocas, partículas ou microesferas. Opcionalmente, o substrato sólido pode estar presente em outras formas ou formatos ou artigos configurados que fornecem uma grande área superficial, suficiente para ligar uma



quantidade detectável de analito.

[0048] Os substratos úteis para criar o meio incluem, porém, sem limitação, microesferas rígidas não porosas, partículas ou empacotamento, espumas reticuladas, um leito monolítico rígido (por exemplo, formado a partir de microesferas ou partículas sinterizadas), uma coluna embalado com pano tecido ou não tecido, uma coluna embalada com um fio ou fibras de monofilamento denso (não microporoso), um filme plano ou membrana de barreira, um cartucho enrolado em espiral formado a partir do filme plano ou membrana densa ou uma combinação de meios, tal como um cartucho misto de microesfera/pano.

[0049] Em determinados casos, um substrato adequado é aquele que é inicialmente microporoso, mas se torna essencialmente nanoporoso quando a superfície é tratada antes, durante ou depois da criação de sítios de adsorção, por exemplo, por meio de um ou mais adsorventes de polissacarídeo ligados em ponto de extremidade. Em uma modalidade, o substrato está na forma de microesferas ou partículas sólidas.

[0050] Em determinados casos, o substrato sólido é uma pluralidade de microesferas de polímero rígido, tal como polietileno, poliestireno, polipropileno, polissulfona, poliacrilonitrila, policarbonato, poliuretano, sílica, látex, vidro, celulose, agarose reticulada, quitina, quitosano, dextrano reticulado, alginato reticulado, silicone, fluoropolímero e microesferas de polímero sintético. De preferência, as microesferas de polímero rígido são microesferas de polietileno.

[0051] O tamanho do substrato sólido pode ser selecionado de acordo com o volume da amostra de teste usada no ensaio ou outros parâmetros. Em algumas modalidades, a pluralidade de microesferas de polímero rígido tem um diâmetro externo médio de cerca de 1  $\mu\text{m}$  a cerca de 1 mm, por exemplo, 1  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$ , 7  $\mu\text{m}$ , 8  $\mu\text{m}$ , 9  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ ,

100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 600  $\mu\text{m}$ , 700  $\mu\text{m}$ , 800  $\mu\text{m}$ , 900  $\mu\text{m}$  e 1 mm. Em outras modalidades, a pluralidade de microesferas de polímero rígido tem um diâmetro médio de cerca de 10  $\mu\text{m}$  a cerca de 200  $\mu\text{m}$ , por exemplo, 10  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 35  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 55  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 95  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 105  $\mu\text{m}$ , 110  $\mu\text{m}$ , 115  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$ , 130  $\mu\text{m}$ , 135  $\mu\text{m}$ , 140  $\mu\text{m}$ , 145  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 155  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 165  $\mu\text{m}$ , 170  $\mu\text{m}$ , 175  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$ , 185  $\mu\text{m}$ , 190  $\mu\text{m}$ , 195  $\mu\text{m}$  e 200  $\mu\text{m}$ . As microesferas úteis têm um tamanho na faixa de cerca de 100 a acima de 500 micra de diâmetro, tal como 100, 200, 300, 400 ou 500 micra. O tamanho médio das microesferas pode ser de 150 a 450 micra. Consultar, por exemplo, o documento WO 2011/068897, cujo conteúdo inteiro está incorporado ao presente documento a título de referência.

[0052] A superfície do substrato sólido pode ser funcionalizada para permitir a ligação covalente do adsorvente de polissacarídeo descrito no presente documento. Em algumas modalidades, a superfície do substrato sólido tem pelo menos um grupo, tal como um grupo amina.

[0053] O meio de adsorção pode estar contido dentro de um alojamento, tal como uma seringa, uma coluna, um cartucho, um tubo, um tubo de centrifugação e similares ou qualquer recipiente. Em algumas modalidades, o recipiente tem um tamanho e um formato particulares de modo que RBCs que não são capturados no meio de adsorção ligado a polissacarídeo possam ser removidos sem perturbar os RBCs parasitados ligados ao meio.

[0054] O alojamento que compreende o meio de adsorção pode conter mais de um tipo de meio de adsorção. Em algumas modalidades, o meio diferente é disposto em camadas em uma disposição do tipo parfait dentro do alojamento de modo que a amostra, por exemplo, sangue total, entre em contato com o meio diferente em série ou fluxo paralelo. Uma disposição do meio diferente dentro de um cartucho é

posicionar um primeiro meio de adsorção na entrada e/ou na saída do cartucho, com, opcionalmente, uma região mesclada contendo o segundo meio de adsorção interposta entre as regiões de entrada e saída. No caso de meio em forma de fibra, um tecido misto, tricotado ou uma estrutura não tecida pode ser preparada por métodos bem conhecidos na indústria têxtil para formar pano a partir da fibra mista. Alternativamente, um fio pode ser preparado a partir de um fio de multifilamento mais fino ou monofilamento produzido a partir de duas ou mais fibras com diferentes químicas de superfície, contanto que um tipo de fibra contenha uma superfície que impede ativamente que o sangue coagule no contato. O fio de fibra mista pode ser, então, usado para preparar pano para contato com sangue.

## **B. ADSORVENTES DE POLISSACARÍDEO**

[0055] Em algumas modalidades, o adsorvente de polissacarídeo é heparina, sulfato de heparano, manose, sulfato de dextrano, ácido hialurônico, ácido siálico, quitosano e uma combinação dos mesmos. Em alguns casos, um ou mais adsorventes de polissacarídeo diferentes, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais adsorventes de polissacarídeo diferentes, estão ligados ao substrato sólido do meio de adsorção. Em algumas modalidades, o adsorvente é heparina. Em algumas modalidades, o adsorvente é sulfato de heparano. Em outras modalidades, o adsorvente é manose. Em outra modalidade, o adsorvente é sulfato de dextrano. Em alguns casos, os adsorventes de polissacarídeo são heparina e manose. Em alguns casos, os adsorventes de polissacarídeo são sulfato de heparano e manose. Em outros casos, os adsorventes de polissacarídeo são heparina e sulfato de dextrano. Em ainda outros casos, os adsorventes de polissacarídeo são manose e sulfato de dextrano.

[0056] Em algumas modalidades, mais de um 1 adsorvente, por exemplo, 2 adsorventes, são ligados em um único substrato sólido. Em alguns casos, a razão entre os dois adsorventes (A e B) está na faixa

de 1:99 a 99:1. Em outras modalidades, o substrato é revestido com cerca de 1 a 50% de adsorvente A e cerca de 1 a 50% de adsorvente B.

[0057] Em algumas modalidades, a manose usada como um adsorvente é um açúcar redutor ou um açúcar não-redutor (por exemplo, um manosídeo). As manoses adequadas incluem, porém, sem limitação, D-manose, L-manose, p-aminofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo, um polissacarídeo contendo manose, e manana. O termo "manose" também inclui um polímero de manose, tal como manana. Manana refere-se a um polissacarídeo vegetal que é um polímero linear da manose de açúcar. As mananas vegetais têm ligações  $\beta$ (1-4). Manana pode também se referir a um polissacarídeo da parede celular encontrado em leveduras. Esse tipo de manana tem uma cadeia principal  $\alpha$ (1-6)-ligada e ramificações  $\alpha$ (1-2) e  $\alpha$ (1-3)-ligadas.

[0058] Em uma modalidade, a manose está ligada por ligação de ponto de extremidade ao substrato sólido. Em outra modalidade, a manose está fixada ao substrato por ligação de múltiplos pontos.

[0059] Em outros casos, a manose é um polímero de manose, tal como manana. Manana refere-se a um polissacarídeo vegetal que é um polímero linear da manose de açúcar. As mananas vegetais têm ligações  $\beta$ (1-4). Manana pode também se referir a um polissacarídeo da parede celular encontrado em leveduras. Esse tipo de manana tem uma cadeia principal  $\alpha$ (1-6)-ligada e ramificações  $\alpha$ (1-2) e  $\alpha$ (1-3)-ligadas.

[0060] Os glóbulos vermelhos infectados por *P. falciparum* expressam proteína de membrana do eritrócito 1 (PfEMP1) que pode se ligar a moléculas de ligação específicas na superfície de células endoteliais e outros RBCs. O método fornecido no presente documento é baseado, em parte, na capacidade de glóbulos vermelhos parasitados de ligar moléculas de ligação selecionadas, tais como polissacarídeos. Além disso, quando essas moléculas de ligação estão ligadas à super-

fície de um meio de adsorção, o meio pode ser usado para separar pRBCs de uma amostra de paciente, que, por sua vez, altera a cor do meio de adsorção. Assim, a presença de uma infecção por malária pode ser determinada colocando-se uma amostra do paciente em contato com uma molécula de ligação ligada a um meio de adsorção.

[0061] As moléculas que podem ligar pRBCs e, em particular, PfEMP1 incluem, porém, sem limitação, polissacarídeos, tais como glicoaminoglicanos, por exemplo, heparina, sulfato de heparano e sulfato de condroitina A (CSA), ácido siaílico, o receptor de complemento 1 (CR1), os antígenos do grupo sanguíneo ABO A e B, ICAM-1, CD36, trombospondina (TSP), receptor de proteína C endotelial (EPCR), E-selectina, molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão de célula endotelial de plaqueta 1 (PECAM-1), molécula de adesão de leucócito endotelial 1 (ELAM-1), proteínas séricas IgG/IgM e fibrinogênio, carboidratos com grupos manose, lectinas e quitosanos. As moléculas de ligação de pRBC adicionais incluem hiluronato, peptidoglicanos, glicoproteínas, glicolipídios, glicanos, glicosilfosfatidilinositol (GPI) glicanos e ácido hialurônico e outros ácidos neuramínicos.

[0062] As moléculas de ligação fornecidas acima podem ser usadas para adsorver pRBCs em uma superfície. Em algumas modalidades, pelo menos um adsorvente de polissacarídeo está ligado a um substrato sólido de alta área superficial para formar um meio de adsorção. Em algumas modalidades, o adsorvente de polissacarídeo é heparina, sulfato de heparano, ácido hialurônico, ácido siálico, carboidratos com sequências de manose e quitosano. Em uma modalidade, o adsorvente de polissacarídeo é heparina.

[0063] Adicionalmente aos carboidratos mistos, é possível incluir porções químicas adicionais específicas para o analito. Essas incluem proteínas, peptídeos, anticorpos, affibodies, ácidos nucleicos e outras

porções químicas de ligação específicas (Consultar a Publicação de Patente nº US 2003/0044769, incorporada ao presente documento a título de referência).

### **C. LIGAÇÃO DE ADSORVENTES DE POLISSACARÍDEO NA SUPERFÍCIE DO MEIO DE ADSORÇÃO**

[0064] Os polissacarídeos podem estar ligados na superfície do meio de adsorção por ligação de ponto de extremidade ligada por ligação covalente única (por exemplo, ligação covalente através do resíduo terminal da molécula de heparina). Uma ligação covalente única no grupo terminar da molécula a ser fixada, em comparação à ligação não covalente ou à ligação por múltiplos pontos, fornece, vantajosamente, melhor controle da orientação das moléculas imobilizadas, maximizando, ao mesmo tempo, sua densidade superficial. Em particular, a ligação de ponto de extremidade desses carboidratos de cadeia longa fornece uma arquitetura de superfície molecular do tipo escova que leva a uma concentração mais alta de posições acessíveis nos oligômeros de carboidrato disponíveis para ligação de analito/patógeno. Em alguns casos, os pRBCs fixam-se às superfícies revestidas com heparina de comprimento completo (por exemplo, heparina com um peso molecular médio de mais de 10 kDa) de modo muito mais eficaz que às superfícies revestidas com fragmentos de heparina, conforme é empregado, de modo geral, na técnica anterior.

[0065] A ligação covalente de um carboidrato (por exemplo, um polissacarídeo) a um substrato sólido fornece controle de parâmetros, tal como densidade superficial e orientação, das moléculas imobilizadas, em comparação à ligação não covalente. Esses parâmetros mostraram fornecer ligação de adsorvato às moléculas de carboidrato imobilizadas. Em determinadas modalidades, a concentração de superfície do carboidrato no substrato sólido está na faixa de 0,01 a cerca de 0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tal como 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08,

0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19 ou  $0,2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Em outras modalidades, a concentração de superfície do(s) adsorvente(s) no substrato sólido está na faixa de 0,001 a  $2,0\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Em outra modalidade, a concentração de superfície do(s) adsorvente(s) no substrato sólido está na faixa de 0,005 a  $0,5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

[0066] Em algumas modalidades, a concentração de superfície do adsorvente no substrato sólido está na faixa de  $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$  a  $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por exemplo,  $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $11\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $12\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $13\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $14\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $16\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $17\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $18\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $19\mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Em outras modalidades, a concentração de superfície do adsorvente no substrato sólido está na faixa de  $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$  a  $15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , por exemplo,  $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $11\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $12\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $13\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $14\mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

[0067] Em algumas modalidades, manose, derivados de manose e oligômeros de manose são acoplados redutivamente a aminas primárias em substratos aminados, tais como microesferas aminadas, por aminação redutora. O acoplamento da forma de aldeído aberto de uma manose redutora a uma microesfera resulta em uma amina secundária estável. As manoses não redutoras que têm uma amina reativa podem ser acopladas a uma microesfera com um intermediário que tem uma funcionalidade de aldeído. Por exemplo, a manose é fixada a um substrato contendo amina por (a) contato de um substrato aminado com uma solução aquosa contendo uma manose para formar um intermediário de base de Schiff; e (b) contato da base de Schiff com um agente redutor para fixar a manose. Em algumas modalidades, se a manose for uma manose não redutora, um aldeído intermediário (por exemplo, glutardialdeído) está ligado ao substrato de amina antes da manose não redutora.

[0068] A manose pode ser dissolvida em solução aquosa, tal como

uma solução aquosa ácida. A solução aquosa de manose está em contato com um substrato aminado, tal como uma microesfera aminada. Uma base de Schiff é gerada. A bases de Schiff é, depois disso, reduzida com um agente redutor. O agente redutor pode ser, por exemplo, cianoboroidreto de sódio ou boroidreto de sódio. Em determinados casos, o substrato sólido é também reagido com heparina que tem uma funcionalidade de aldeído reativo.

[0069] Para ligação de heparina, uma função de aldeído mais reativa no resíduo terminar de redução pode ser atingida por degradação parcial com ácido nitroso. Isso encurta o tempo de reação, mas a heparina imobilizada terá um peso molecular mais baixo. O acoplamento é realizado em solução aquosa, por aminação redutora (cianoboroidreto).

[0070] A ligação covalente de moléculas de heparina de comprimento completo a uma superfície pode ser atingida pela reação de um grupo aldeído com um grupo amino primário presente na superfície do meio de adsorção. Uma propriedade inerente de todos os carboidratos é que os mesmos têm um hemiacetal em sua extremidade de redução. Esse acetal está em equilíbrio com a forma de aldeído e pode formar bases de Schiff com aminas primárias. Essas bases de Schiff pode, então, ser reduzidas em aminas secundárias estáveis. Em algumas modalidades, a heparina de comprimento completo é imobilizada em superfície no substrato sólido por conjugação covalente. Em outras modalidades, a heparina de comprimento completo está covalentemente ligada ao dito meio de adsorção por meio de um grupo amino secundário estável.

[0071] Em algumas modalidades, as moléculas de heparina de comprimento completo imobilizadas têm um peso molecular médio de mais de 10 kDa. Em outras modalidades, as moléculas de heparina imobilizadas têm um peso molecular médio de mais de 15 kDa. Em outra modalidade, as moléculas de heparina imobilizadas têm um peso



molecular médio de mais de 21 kDa. Em ainda outra modalidade, as moléculas de heparina imobilizadas têm um peso molecular médio de mais de 30 kDa. De preferência, as moléculas de heparina imobilizadas têm um peso molecular médio dentro da faixa de 15 a 25 kDa. O peso molecular médio pode ser também mais alto, tal como na faixa de 25 a 35 kDa.

[0072] Em determinados casos, vários métodos para produzir adsorventes e os adsorventes em si são revelados nas Patentes n<sup>os</sup> US 8.663.148 e 8.758.286; e Publicações de Patente n<sup>os</sup> US 2009/0136586, 2012/0305482 e US 2014/231357, cujas revelações estão incorporadas ao presente documento a título de referência para todos os propósitos.

#### **D. ANALITOS/PATÓGENOS QUE LIGAM ADSORVENTES LIGADOS AO MEIO DE ADSORÇÃO**

[0073] Os adsorventes ligados ao meio de adsorção podem ser usados para ligação a um analito/patógeno de interesse em uma amostra. Em algumas modalidades, a amostra é selecionada a partir do grupo que consiste em sangue total, soro, plasma, urina, fezes, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavagem bronquial, outro fluido corporal e combinações dos mesmos. Em alguns casos, a amostra é sangue total de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo humano.

[0074] O analito/patógeno pode incluir, porém, sem limitação, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, vírus Ebola (EBOV), *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, bactérias enterobacteriaceae resistentes a carbapenem (CRE), (por exemplo, *Escherichia coli* resistente a carbapenem e *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem), um patógeno produtor de ESBL (por exemplo, *E. coli* que produz ESBL, *K. pneumoniae* que produz ESBL e *K. oxytoca* que produz ESBL),

bactérias *enterococci* resistentes à vacomicina (VRE) (por exemplo, *E. faecalis* resistente à vacomicina e *E. faecium* resistente à vacomicina), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, citomegalovírus (CMV), vírus do herpes simples 1 (HSV1), vírus do herpes simples 2 (HSV2) e qualquer combinação dos mesmos.

[0075] Em determinados outros casos, o analito/patógeno de interesse inclui, porém, sem limitação, Vírus da Hepatite A (HAV), Vírus da Hepatite B (HBV), Vírus da Hepatite C (HCV), Vírus da Hepatite D (HDV), Vírus da Hepatite G/Vírus GB-C (HGV/GBV-C), Vírus da Imunodeficiência Humana tipos 1 e 2 (HIV-1/2), Vírus Linfotrófico de Células T Humanas tipos I e II (HTLV-I/II), Citomegalovírus (CMV), Vírus de Epstein-Barr (EBV), Vírus TT (TTV), Vírus do Herpes Humano tipo 6 (HHV-6), Vírus SEN (SEN-V) e Parvovírus Humano (HPV-B19).

[0076] Os vírus adicionais de interesse incluem, sem limitação, vírus do herpes humano tipo 7 (HHV-7), vírus do herpes humano tipo 8 (HHV-8), vírus influenza tipo A, incluindo os subtipos H1N1 e H5N1, coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS) e vírus de RNA que causam febre hemorrágica, tais como Arenaviridae (por exemplo, vírus da febre de Lassa (LFV)), Filoviridae (por exemplo, vírus Ebola (EBOV) e vírus Marburg (MBGV)); Bunyaviridae (por exemplo, vírus da febre do Vale do Rift (RVFV) e vírus da febre hemorrágica da Crimeia-Congo (CCHFV)); e Flaviviridae (vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da Dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus GB C (GBV-C), formalmente conhecido como vírus da Hepatite G (HGV).

[0077] Em determinados casos, as bactérias incluem, porém, sem limitação, *Treponema Pallidum* (TP, o agente da sífilis), *Yersinia Enterocolitica* e *Staphylococcus* e espécies de *Streptococcus* (agentes comuns de contaminação bacteriana) e parasitas, tais como espécies de *Plasmodium* (o agente da malária), *Trypanosoma Cruzi* (agente da do-

ença de Chagas) e *Babesia Microti* (agente de babesiose). As bactérias adicionais incluem, porém, sem limitação, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Eikenella corrodens*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* e *Deinococcus radiodurans*.

[0078] Adicionalmente, podem ser detectados patógenos transmissíveis pelo sangue emergentes, tal como *Candida sp.*, incluindo *Candida albicans*, *Aspergillus sp.*, incluindo *Aspergillus fumigatus*, Vírus da Hepatite E (HEV), vírus do Herpes Humano tipo 8 (HHV-8), *Borrelia Burgdorferi* (agente doença de Lyme) e o agente desconhecido da doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD).

[0079] Os patógenos conhecidos por ligar-se à heparina/sulfato de heparano podem ser usados nos métodos descritos no presente documento. Os exemplos não limitantes de tais patógenos incluem bactérias, por exemplo, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenzae nontypable*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Orientia tsutsugamushi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*; vírus, por exemplo, vírus adeno-associado tipo 2, adenovírus, coronavírus, coxsackievírus, citomegalovírus, vírus da Dengue, FMDV, HSV1, HSV2, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, HHV8, HIV1, HPV, HTLV1, vírus da encefalite japonesa, vírus pseudorabies, vírus sincicial respiratório, rinovírus, sindbis vírus, vaccinia vírus, vírus do Nilo Ocidental, vírus da febre amarela; parasi-

tas, por exemplo., *Giardia lamblia*, *Leishmania* spp., *Encephalitozoon* spp., *Neospora caninum*, *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, e príons. Consultar, por exemplo, Barlett e Park, "Chapter 2 Heparan Sulfate Proteoglycans in Infection" em M.S.G. Pavao, ed. *Glycans in Diseases and Therapeutics, Biology of Extracellular Matrix*, Heidelberg:Spring-Verlag, 2011.

## **E. MÉTODOS PARA DETECTAR ANALITOS/PATÓGENOS**

[0080] É fornecido no presente documento um método para reduzir as células sanguíneas em uma amostra biológica de um indivíduo que está infectado ou sob suspeita de estar infectado com o dito analito/patógeno. O método pode ser usado para remover células sanguíneas que podem interferir na sensibilidade de técnicas convencionais usadas para detectar o analito/patógeno de interesse. O método pode incluir expor a amostra que inclui células sanguíneas ao meio de adsorção descrito no presente documento sob condições para formar um complexo aderente que inclui o analito/patógeno e o meio de adsorção. As células sanguíneas da amostra podem ser separadas do complexo aderente por, por exemplo, gravidade, ou outros meios que mantenham o complexo aderente. Em alguns casos, uma solução salina, tal como uma solução salina normal, por exemplo, uma solução de cerca de 0,90% em p/v de NaCl, cerca de 300 mOsm/l, uma solução salina a 0,01 N ou uma solução similar, é aplicada ao complexo aderente que inclui o meio de adsorção para remover por lavagem as células sanguíneas remanescentes.

[0081] Também é fornecido no presente documento um método para concentrar analitos/patógenos infecciosos em uma amostra obtida a partir de um indivíduo que está infectado ou sob suspeita de estar infectado com os ditos analitos/patógenos. A amostra pode ser exposta ao meio de adsorção descrito no presente documento sob condições para formar um complexo aderente que inclui o meio de adsorção e os

analitos/patógenos. Os componentes da amostra que não são parte do complexo aderente podem ser separados por, por exemplo, gravidade, sem perturbar o complexo aderente. O complexo aderente que inclui o meio de adsorção pode ser lavado com um tampão de lavagem, tal como uma solução salina normal ou uma solução que mantenha (preserve) o complexo. Em alguns casos, uma solução salina normal é uma solução de cerca de 0,90% em p/v de NaCl, cerca de 300 mOsm/l, uma solução salina a 0,01 N ou uma solução similar. O complexo pode ser perturbado para separar os analitos/patógenos do meio de adsorção aplicando-se um tampão de eluição, tal como uma solução salina altamente iônica, ao complexo. Em alguns casos, uma solução salina altamente iônica é uma solução salina a 2 N. Em outros casos, o tampão de eluição é um tampão que pode romper a ligação do adsorvente de polissacarídeo e do analito/patógeno. Em algumas modalidades, diferentes analitos/patógenos podem ser eluídos do meio de adsorção em diferentes frações com o uso de vários tampões de eluição para o analito/patógeno particular de interesse. Similarmente a uma coluna de cromatografia, analitos/patógenos específicos podem ser eluídos em tempo diferente em agrupamentos diferentes. O analito/patógeno de interesse pode ser eluído em uma ou mais frações.

[0082] Esse processo concentra analitos/patógenos, que pode ser, então, identificado e analisados com o uso de métodos padrão conhecidos por aqueles na técnica. Por exemplo, patógenos bacterianos, virais, fúngicos, protozoários, parasíticos e microbianos podem ser detectados com o uso de ensaios, tais como ensaios colorimétricos, imunoensaio (por exemplo, ensaios de sanduíche ou ensaios de fita de imersão), ensaios de imunossorvente ligado a enzima (ELISAs), ensaios baseados em PCR (por exemplo, RT-PCR, qPCR, ensaios TaqMan®), ensaios de proliferação de patógeno (por exemplo, ensaios de resistência a fármaco ou antibiótico) e variantes dos mesmos. Por

exemplo, RNA de HCV é detectado com o uso de RT-PCR com o uso de um kit padrão, tal como teste de HCV COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) e RealTime HCV Genotype II (Abbott Molecular, Abbott Park, IL). O vírus Ebola pode ser detectado com o uso de, por exemplo, BioFire Diagnostics' FilmArray e o Ebola Virus VP40 Real-time RT-PCR Assay do CDC.

[0083] Os patógenos resistentes a fármaco podem ser detectados cultivando-se o patógeno na presença do fármaco. Por exemplo, um patógeno sob suspeita de ser *Klebsiella* ou *E.coli* resistente a carbapenem pode ser usado para inocular um meio de crescimento contendo ertapenem ou meropenem. Após cultura adequada, a cultura em caldo incubada pode ser subcultivada em uma placa de ágar de MacConkey. No dia seguinte, a placa de ágar pode ser examinada quanto a colônias de fermentação de lactose (rosa-vermelho). Adicionalmente, as colônias isoladas podem ser triadas com o uso de um teste fenotípico quanto à produção de carbapenemase, tal como Teste de Hodge Modificado (MHT).

[0084] Em determinados casos, o analito de interesse pode ser detectado e/ou identificado com o uso de técnicas de laboratório típicas, tal como ensaio de imunossorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e cromatografia de afinidade. Por exemplo, em determinados casos, um kit ELISA comercialmente disponível pode ser usado ou é facilmente desenvolvido. No ELISA, um anticorpo específico é passivamente absorvido a uma placa. Os sítios não específicos são bloqueados com uma solução proteica que não tem parte ativa na reação imunoquímica específica de um ensaio particular. Um analito/patógeno específico é capturado pelo anticorpo na superfície e, então, detectado por outro anticorpo com uma identificação enzimática. A identificação enzimática é reagida com reagentes específicos, e a presença do analito é detectada e identificada.

[0085] Em determinados outros casos, uma microbalança de cristal de quartzo (QCM) pode ser usada para detectar o analito adsorvido à superfície. Uma microbalança de cristal de quartzo é um detector/sensor muito sensível e não dispendioso que produz uma troca de frequência em vibração de cristal de quartzo quando as moléculas interagem com sua superfície. A QCM detecta uma alteração física tal como uma passa por área unitária medindo a mudança em frequência de ressonador de cristal de quartzo. Em líquido, a QCM é altamente eficaz na determinação da afinidade de moléculas às superfícies funcionalizadas com sítios de reconhecimento. Entidades maiores, tais como vírus e micróbios, podem ser também reconhecidas. Por exemplo, as QCMs podem ser acopladas a anticorpos, permitindo a captação seletiva de um conjugado de anticorpo. Em determinados casos, o eluente contém um analito ou patógeno de interesse. A QCM tem conjugado à mesma um anticorpo específico para o analito. Colocando-se a QCM em contato com o eluente que contém o analito/patógeno, o analito se liga à superfície de da QCM, e a QCM capta a ligação, presença ou sua identidade. Outras moléculas de afinidade podem ser também ligadas à superfície, tais como ácidos nucleicos, carboidratos, peptídeos, proteínas e similares.

[0086] Em ainda outros casos, técnicas de ressonância de plásmon de superfície (SPR) podem ser usadas para detectar a presença e/ou identidade do analito/patógeno. O plásmon de superfície é um nome quântico para uma onda de densidade de carga elétrica que se propaga em uma interface entre um metal e um dielétrico, assim como um próton é um nome quântico para uma onda de luz. Os plásmons de superfície ressonam mediante excitação por radiação eletromagnética que entra em uma interface de material metálico e um material dielétrico. O plásmon de superfície responde às alterações no ambiente em estreita proximidade com a interface. Esse fato torna a ressonância de

plásmon de superfície útil para a detecção de interações biomoleculares. Como a QCM, é possível identificar a superfície SPR com um anticorpo ou porção química de ligação, tal como um antígeno de um analito/patógeno de interesse.

[0087] O método para concentrar analitos/patógenos do sangue, por exemplo, sangue inteiro ou soro, ou para reduzir as células sanguíneas do sangue pode incluir colocar o sangue em contato com um sólido, essencialmente substrato microporoso, que foi tratado em superfície com um adsorvente de polissacarídeo que tem uma afinidade de ligação para os analitos/patógenos a serem removidos (os adsorvatos). O tamanho dos canais intersticiais dentro do dito meio é balanceado com a quantidade de área superficial de meio e a concentração de superfície de sítios de ligação no meio a fim de fornecer capacidade adsorptiva adequada enquanto também permite taxas de fluxo relativamente altas de sangue através do meio adsorvente. O resultado é que o transporte de adsorbatos para os sítios de ligação no meio ocorre amplamente por convecção forçada, não por difusão lenta. Por convecção (forçada) quer-se dizer, por exemplo, fluxo produzido por um gradiente de pressão gerado por uma bomba ou uma seringa pela aplicação de pressão externa a um contentor flexível (ou pressão interna a um contentor rígido), por uma cabeça gravitacional/diferença de elevação, ou peça diferença em pressão arterial e pressão venosa no paciente que é tratado com um dispositivo extracorpóreo.

#### **F. MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR UMA INFECÇÃO POR MALÁRIA**

[0088] São fornecidos no presente documento métodos para usar um meio de adsorção que compreende substrato sólido imobilizado por heparina para determinar a presença de uma infecção por malária. Uma amostra coletada de um indivíduo sob suspeita de ter malária pode ser testada quanto aos glóbulos vermelhos infectados (RBCs) ou RBCs parasitados com o uso do método descrito no presente docu-



mento. Esse método é baseado na observação de que proteína de ligação de sulfato de heparano localizadas na superfície celular de RBCs parasitados podem aderir à heparina, sulfato de heparano ou outros polissacarídeos que estão ligados em uma superfície sólida. Adicionalmente, o método pode ser utilizado para determinar se o indivíduo deve receber uma terapia antimalária. Além disso, o método pode ser usado para monitorar a progressão da malária em um indivíduo que recebeu a dita terapia.

[0089] Uma amostra pode ser obtida a partir de um indivíduo (por exemplo, indivíduo humano) sob suspeita de ter uma infecção por malária. Em algumas modalidades, a amostra é um membro selecionado a partir do grupo que consiste em sangue total, soro, plasma, urina, esputo, fluido de lavagem bronquial, lágrimas, aspirado do mamilo, linfa, saliva, fluido cérebro-espinhal, tecido e combinações dos mesmos. De preferência, a amostra é sangue total.

[0090] A amostra é, então, colocada em contato com o meio de adsorção sob condições para permitir que o adsorvente de polissacarídeo na superfície do substrato sólido se ligue a um glóbulo vermelho parasitado, se presente na amostra, para formar um complexo aderente.

[0091] Em alguns casos, após a formação do complexo aderente, a amostra e o meio de adsorção são separados sem romper ou separar o complexo do meio.

[0092] A presença do complexo aderente é detectada inspecionando-se a cor do meio de adsorção dentro do espectro de luz visível (por exemplo, comprimento de onda de cerca de 400 nm a cerca de 700 nm). Em alguns casos, a cor detectável está dentro da faixa de comprimento de onda de cerca de 625 nm a 740 nm, ou a faixa correspondente à cor vermelha ou variações da mesma. A cor do meio de adsorção pode ser determinada com o uso de um detector óptico de luz visível ou o olho humano.

[0093] Em determinados casos, é possível concentrar o analito (por exemplo, vírus, patógeno, bactéria, citocina ou complexo aderente) no meio e detectar o analito por uma alteração de cor do meio. Em uma modalidade alternativa, é possível concentrar o analito a ser detectado eluindo-se o analito da coluna, concentrando-se o analito e medindo-se uma alteração de cor de meio. Outras formas de detecção são também possíveis.

[0094] Em algumas modalidades, a cor do meio de adsorção de teste é comparada a um meio de adsorção de controle. Em algumas modalidades, o meio de controle (por exemplo, controle negativo para infecção) é um meio de adsorção que foi exposto a uma amostra coletada de um controle saudável, tal como um indivíduo que não tem uma infecção por malária. Em outras modalidades, o meio de controle (por exemplo, controle positivo) é um meio de adsorção que foi exposto a uma amostra coletada de um indivíduo que tem uma infecção por malária (por exemplo, infecção por malária não complicada ou grave).

[0095] Se o meio de adsorção do indivíduo de teste tiver uma cor similar àquela do controle saudável, então, o ensaio indica a ausência do complexo aderente. Todavia, se o meio de adsorção do indivíduo de teste tiver uma cor similar àquela do controle positivo, então, o ensaio indica a presença do complexo aderente e, assim, uma infecção por malária.

[0096] Se a presença do complexo aderente for detectada, então, o indivíduo pode receber uma terapia antimalária. Os exemplos não limitantes de uma terapia antimalária incluem cloroquina (Aralen), sulfato de quinina (Qualaquin), hidroxicloroquina (Plaquenil), atovaquona-proguanil (Malarone), artemeter-lumefantrina (Coartem), mefloquina (Lariam), primaquina, amodiaquina, quinina, quinidina, doxiciclina, clindamicina, sulfonamidas, tais como sulfadoxina e sulfametoxipiridazina, pirimetamina, halofantrina, artemisinina, derivados de artemisinina dos mesmos

e combinações dos mesmos. Os derivados de a incluem artemeter, artesunato, di-hidroartemisinina, artenimol, artemotil e arteeter. Outros derivados de artemisinina que são fármacos antimalária adequados são encontrados, por exemplo, nas Patente n<sup>os</sup> US 8.722.910; 8.481.757; 8.304.440; 7.851.512; 7.776.911; 7.084.132; 6.586.464; 6.362.219; e nas Publicações de Patente n<sup>os</sup> US 2012/0258945, 2013/0072513, 2013/071474, 2014/011829, 2014/011830 e 2014/256761.

#### **G. RBCS INFECTADOS PODEM SE LIGAR A MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO DE RBC NA SUPERFÍCIE DO MEIO DE ADSORÇÃO**

[0097] Os glóbulos vermelhos infectados podem ser retidos na superfície de um meio de absorção ligado por um polissacarídeo, tal como, porém, sem limitação, sulfato de heparano, heparina, sulfato de condroitina e derivados dos mesmos. Os exemplos não limitantes de agentes de infecção, tais como vírus e patógenos (por exemplo, bactérias e parasitas) que podem se ligar a sulfato de heparano, heparina e análogos dos mesmos incluem bactérias, por exemplo, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Borrelia burdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Hemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Orientia tsutsugamushi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Yersinia enterocolitica*, vaccinia vírus, por exemplo, vírus da varíola bovina, vírus da varíola dos coelhos, vírus de mixoma e vírus do fibroma de Shope, HIV-1, HPV, HTLV1, vírus da hepatite C, vírus da hepatite B, vírus adeno-associados (AAV), adenovírus, coronavírus, coxsackievírus, citomegalovírus, herpesvírus, por exemplo, Herpesvírus-4 de Murid (MuHv-4), herpesvírus associado a sarcoma de Kaposi (KSHV), vírus de Epstein-Barr (EBV), FMDV, vírus do herpes simples, por exemplo, HSV-1 e

HSV-2, vírus pseudorabies (PrV), vírus pseudorabies, vírus sincicial respiratório, rinovírus, vírus sidbis, flavivírus, por exemplo, vírus da dengue (dengue 1, 3, 4), vírus da encefalite japonesa, vírus kunjin, vírus da encefalite do Vale Murray, vírus de powassan, vírus da encefalite de St. Louis, vírus da encefalite transmissível por carrapato, vírus do Nilo Ocidental, vírus da febre amarela, pestivírus, por exemplo, vírus que causam doença da fronteira, diarreia viral bovina, febre suína clássica, vírus da febre hemorrágica, por exemplo, vírus Ebola, vírus Marburg, vírus da febre de Lassa, vírus do Vale Rift, outros vírus arenaviridae, outros vírus bunyaviridae e outros vírus filoviridae, e parasitas, por exemplo, *Giardia lamblia*, *Leishmania* ssp., *Encephalitozoon* spp., *Neospora caninum*, *Plasmodium* ssp., *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

#### **H. CONCENTRADORES E KITS**

[0098] Em determinadas modalidades, a presente invenção fornece um concentrador em uma forma que se assemelha a uma seringa hipodérmica. A Figura 1 é uma modalidade do concentrador da presente invenção. O concentrador 100 tem um tambor 118 preenchido com meio de adsorção 105. Em determinados casos, o tambor é uma porção de tambor cilíndrico 118 com adsorvato contido na mesma 105, com uma extremidade terminando em um tubo de saída 117 de um diâmetro menor que o diâmetro da porção de tambor cilíndrico 118. Em alguns casos, uma agulha hipodérmica oca 112 se comunica com o tubo de saída 117 da porção de tambor 118. Em alguns casos, um ou mais adsorventes de polissacarídeo diferentes, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais adsorventes de polissacarídeo diferentes, estão ligados ao meio de adsorção. O concentrador 100 tem um êmbolo 130 com uma haste 115 que permite que o usuário remova uma amostra de um indivíduo com o uso de uma agulha 112 que está ligada ao concentrador 100. A agulha pode ser de vários calibres conforme sejam típicos

para a amostra que é removida de um indivíduo. Em determinados aspectos, o concentrador 100 tem um reservatório opcional 110 preenchido com fluido, tal como solução salina, água ou um tampão. Em operação, a agulha é inserida em um indivíduo para remover uma amostra, tal como sangue. Conforme o êmbolo 130 é retirado do tambor 118 com o uso da haste 115, uma barreira rompível 108 entre o reservatório 110 e o meio 105 é rompida por ação do êmbolo retirado, permitindo que o fluido seja extraído através do meio para umedecer ou preparar o meio. O fluido (por exemplo, solução salina) é extraído através do meio 105 e termina na área 121. Em determinados casos, o reservatório opcional 110 compreende uma vedação ou barreira rompível 108, tal como uma folha metálica, um adesivo ou um plástico, disposta entre o tubo de saída e o adsorvato 105.

[0099] Conforme uma amostra (por exemplo, sangue) é extraída através do meio, o analito ou patógeno contido na mesma adere ao meio. Em determinados casos, o êmbolo retirado 115 pode ser empurrado pelo usuário de volta em direção ao tambor do concentrador. Em determinados casos, a amostra, tal como o sangue removido, pode ser injetada de volta e retornada ao indivíduo. Essa operação para frente e para trás do êmbolo pode ser repetida diversas vezes a fim de concentrar o analito/patógeno no meio. A operação de remoção do êmbolo para frente e para trás pode ser repetida 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou ainda mais vezes.

[00100] O analito/patógeno pode ser removido do meio com o uso dos métodos ensinados no presente documento. Por exemplo, em determinados casos, solução salina normal pode ser usada para remover quaisquer células aderentes e restos. Depois disso, uma solução salina a 2 N pode ser usada para remover o analito ou patógeno. Em determinados outros casos, um tampão ou solução salina é usado para remover todos os componentes de amostra aderentes.

[00101] Em ainda outros aspectos, é usado um filtro de esterilização que pode estar ligado ao exterior do concentrador 100. Por exemplo, a agulha pode ser removida, e o filtro ligado, ou a agulha tem um adaptador de filtro. O filtro permite que o concentrador seja adaptável para uso em campo. Por exemplo, no campo, água ou fluido estéril pode não estar disponível. Em determinados casos, água ou fluido impuro é extraído através do filtro e, agora, esterilizado através do meio 105. Em determinados casos, o reservatório 110 é opcionalmente removido, e a água esterilizada ou fluido esterilizado extraído através do filtro de esterilização prepara ou umedece o meio.

[00102] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um kit que compreende um concentrador. Em determinados aspectos, o kit inclui uma embalagem que pode ser usada para reter o concentrador antes e após o uso. O concentrador pode ser usado conforme discutido acima e, posteriormente, enviado para análise adicional. O kit inclui, opcionalmente, instruções para uso.

[00103] Em um aspecto, o concentrador compreende:

a) uma porção de tambor cilíndrico 118 com adsorvato contido na mesma 105, em que uma extremidade termina em um tubo de saída 117 de um diâmetro menor que o diâmetro da porção de tambor cilíndrico 118;

b) uma agulha hipodérmica oca 112 que se comunica com o tubo de saída 117 da dita porção de tambor 118;

c) um êmbolo 130 que compreende um material elastomérico disposto no interior e adaptado para movimento recíproco dentro do dito tambor cilíndrico 118;

d) meio de haste 115 ligado ao dito êmbolo 130 e que se estende para fora da extremidade da dita porção de tambor 118 oposta ao tubo de saída 117 e operacional para conferir movimento recíproco ao dito êmbolo 130 em direção a e na direção oposta ao tubo de

saída da dita porção de tambor 118; e

e) um reservatório opcional 110 com uma vedação rompível 108, disposto entre o tubo de saída e o adsorvato.

### **III. EXEMPLOS**

[00104] Os exemplos a seguir são oferecidos para ilustrar, porém, não limitar, a invenção reivindicada.

#### **EXEMPLO 1: DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA EM INDIVÍDUOS COM O USO DE UM MEIO DE ADSORÇÃO CONJUGADO À HEPARINA**

[00105] Esse exemplo ilustra o uso de um meio de adsorção conjugado à heparina para detectar glóbulos vermelhos parasitados (pRBCs) em uma amostra de sangue de um indivíduo sob suspeita de ter uma infecção por malária.

[00106] Uma amostra de sangue total é coletada de um indivíduo por métodos padrão e seguindo as diretrizes clínicas. A amostra de sangue (amostra de teste) é colocada em contato com heparina imobilizada na superfície do meio de adsorção sob condições para permitir que quaisquer glóbulos vermelhos parasitados na amostra de teste se liguem à heparina imobilizada. Em seguida, a amostra não ligada é removida sem perturbar o complexo aderente formados pelos pRBCs e a heparina no meio de adsorção de teste. O meio de teste é, então, observado com o uso do olho nu para detectar qualquer alteração em cor em comparação com um meio de adsorção para sangue total livre de glóbulos vermelhos parasitados. Se uma alteração de cor for detectada (por exemplo, o meio de teste parece mais vermelho), isso indica que o indivíduo provavelmente tem uma infecção por malária.

[00107] A cor do meio de teste é comparada à cor de um meio de adsorção exposto a uma amostra de sangue de um controle saudável, tal como um indivíduo que não tem infecção por malária. O indivíduo é diagnosticado como não tendo uma infecção por malária se o meio de adsorção de teste e o meio de controle saudável tiverem cor similar. A

cor do meio de teste é comparada à cor de um meio de adsorção exposto a uma amostra de sangue de um controle positivo, tal como um paciente com malária não complicada ou malária grave. O indivíduo é diagnosticado como tendo uma infecção por malária se o meio de adsorção de teste e o meio de controle positivo tiverem cor similar.

## **EXEMPLO 2: UM SISTEMA PARA DIAGNOSTICAR UMA INFECÇÃO VIRAL E TRATAR EXTRACORPORALMENTE A INFECÇÃO**

[00108] Esse exemplo ilustra um sistema da presente invenção.

[00109] O sistema compreende pelo menos dois cartuchos, em que o primeiro cartucho é um cartucho de diagnóstico menor, e o segundo cartucho é um cartucho terapêutico maior. O primeiro cartucho ou cartucho de diagnóstico contém uma coluna curta entre 3 a 6 ml, que é preenchida com microesferas heparinizadas. O primeiro cartucho é usado para a detecção de uma amostra de sangue sob suspeita de conter vírus da hepatite C (HCV).

[00110] Uma amostra de sangue de 2 ml é obtida a partir do indivíduo. A amostra de sangue é carregada na coluna de diagnóstico e forma um complexo aderente que compreende o meio de adsorção e HCV. Depois disso, a coluna é lavada com um tampão de lavagem de solução salina a 0,01 N. A coluna é, depois disso, lavada aplicando-se um tampão de eluição de solução salina a 2 N ao concentrado do patógeno infeccioso.

[00111] RNA de HCV é detectado com o uso de RT-PCR com o uso de um kit padrão, tal como teste de HCV COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) e RealTime HCV Genotype II (Abbott Molecular, Abbott Park, IL).

[00112] O segundo cartucho terapêutico maior é constituído por microesferas revestidas heparinizadas. Uma coluna de adsorção de 300 é fixada a um apoio vertical. Os 300 ml de microesferas são, então, adicionados ao cartucho e vedados.



[00113] O paciente usa remoção extracorpórea do HCV com o uso da coluna terapêutica. A ligação do vírus da hepatite C à heparina ocorre. A heparina é eficaz para identificar e remover o agente infeccioso.

**EXEMPLO 3: PROCESSAMENTO DE UMA AMOSTRA DE UM INDIVÍDUO SOB SUSPEITA DE ESTAR INFECTADO COM VÍRUS EBOLA ANTES DA DETECÇÃO DO VÍRUS**

[00114] Esse exemplo ilustra o uso de uma modalidade exemplificativa da presente invenção para isolar partículas de vírus Ebola de uma amostra biológica de um indivíduo infectado com vírus Ebola.

[00115] Uma amostra de sangue total infectada com Ebola é circulada por uma coluna preenchida com microesferas heparinizadas. Em vários pontos no tempo, o fluxo passante da coluna é coletado e testado quanto à presença de Ebola. As microesferas heparinizadas são delicadamente lavadas com uma solução salina a 0,01 N sem perturbar a matriz de microesferas. O fluxo passante da etapa de lavagem é coletado e testado quanto a Ebola. O fluxo passante contém células, tais como células sanguíneas, que podem interferir na sensibilidade de ensaios de detecção viral comerciais. Um tampão de eluição contendo solução salina a 2 N é aplicado à coluna, e o eluente é coletado. O eluente é testado quanto à presença de Ebola com o uso do protocolo do CDC "Ebola Virus VP40 Real-Time RT-PCR Assay". Esse método usa um ensaio TaqMan® para detectar a proteína viral 40 do vírus Ebola.

**EXEMPLO 4: PROCESSAMENTO E CONCENTRAÇÃO DE PATÓGENOS A PARTIR DE UMA AMOSTRA DE SANGUE COM O USO DE MICROESFERAS MODIFICADAS POR ADSORVENTE DE POLISSACARÍDEO**

[00116] Esse exemplo ilustra o uso de uma modalidade exemplificativa da presente invenção para remover e concentrar 14 patógenos diferentes de uma amostra biológica.

[00117] Aproximadamente 0,6 grama de meio de adsorção, tal como meio de heparina apenas, meio de manose apenas, meio de PEI de polietilenimina, um compósito de meio de heparina e manose ou um compósito de meio de heparina e manose e microesferas desprotegidas, foi embalado em seringas de filtro de 2,5 ml (Mobicol) com placas de extremidade de 100 µm. 2 ml das suspensões de patógeno em sangue foram preparados cultivando-se os patógenos (por exemplo, *P. aeruginosa*, MRSA, *K. pneumonia* que produz ESBL, *K. pneumonia* resistente a carbapenem, *K. pneumonia*, *E. coli* resistente a carbapenem, *E. coli*, *S. pneumonia*, *E. faecalis*, *E. faecalis* resistente à vancomicina, *E. faecium*, *A. baumannii*, *C. albicans* e CMV) de um dia para outro e diluindo-se até as concentrações adequadas (Tabela 1). As seringas de filtro embaladas foram enxaguadas com 3 ml de PBS, seguidas por passagem da suspensão de patógeno pelas seringas três vezes. 1,0 ml do tampão de eluição (solução salina a 2 N) foi passado pelas seringas, e o fluxo passante (eluente) foi coletado. Diluição padrão e técnicas de plaqueamento foram usadas para enumerar os patógenos do eluente. O teste foi replicado duas vezes ou três vezes para cada meio, e a combinação de patógenos foi analisada. Os resultados são mostrados nas Tabelas 1 e 2.

**TABELA 1. CONCENTRAÇÃO DE PATÓGENO APÓS A PASSAGEM SOBRE O MEIO DE ADSORÇÃO MODIFICADO**

Contagem de Patógenos (CFU/ml ou PFU/ml)						
		Concentração Final				
Bactérias	Concentração Inicial	Heparina	Manose	PEI	Hep/Man (0,6 g)	Hep/Man/PEI (0,6 g)
<i>P. aeruginosa</i>	4,02E+05	5,27E+05	3,79E+05	4,73E+05	4,67E+05	2,75E+05
MRSA	1,21E+05	1,02E+04	1,22E+05	1,48E+04	2,03E+04	3,07E+03
<i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	2,82E+05	1,72E+05	1,98E+05	1,80E+05		
<i>K. pneumoniae</i> (CRE)	1,40E+05	7,83E+01	1,70E+02	2,07E+02	2,07E+02	1,88E+02
<i>K. pneumoniae</i>	4,02E+05	2,55E+05	2,66E+05	1,64E+05		
<i>E. coli</i> (CRE)	2,57E+05	1,90E+02	2,25E+02	1,83E+02	2,00E+02	2,27E+02
<i>E. coli</i>	6,15E+05	1,54E+03	8,92E+02	1,01E+03		

Contagem de Patógenos (CFU/ml ou PFU/ml)						
		Concentração Final				
Bactérias	Concentração Inicial	Heparina	Manose	PEI	Hep/Man (0,6 g)	Hep/Man/PEI (0,6 g)
<i>S. pneumoniae</i>	9,80E+04	4,60E+04	5,80E+04	7,48E+04		
<i>E. faecalis</i>	6,43E+05	6,17E+03	5,83E+03	3,34E+03		
<i>E. faecalis</i> (VRE)	6,17E+05	5,40E+04	5,42E+04	4,80E+04		
<i>E. faecium</i>	9,17E+05	4,00E+05	5,67E+05	5,33E+05		
<i>A. baumannii</i>	1,83E+05	3,82E+04	1,82E+04	8,50E+04		
<i>C. albicans</i>	3,35E+05	2,15E+05				
CMV	7,59E+04	1,35E+04				

**TABELA 2. QUANTIDADE DE PATÓGENO REMOVIDA DE UMA AMOSTRA DE SANGUE**

CFU ou PFU removida por grama de meio					
	Heparina	Manose	PEI	Hep/Man	Hep/Man/PEI
<i>P. aeruginosa</i>	0,00E+00	7,67E+04	0,00E+00	0,00E+00	4,23E+05
MRSA	3,69E+05	-3,33E+03	3,54E+05	3,36E+05	3,93E+05
<i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	3,67E+05	2,80E+05	3,40E+05		
<i>K. pneumoniae</i> (CRE)	4,66E+05	4,66E+05	4,66E+05	4,66E+05	4,66E+05
<i>K. pneumoniae</i>	4,90E+05	4,53E+05	7,93E+05		
<i>E. coli</i> (CRE)	8,56E+05	8,56E+05	8,56E+05	8,56E+05	8,56E+05
<i>E. coli</i>	2,04E+06	2,05E+06	2,05E+06		
<i>S. pneumoniae</i>	1,73E+05	1,33E+05	7,73E+04		
<i>E. faecalis</i>	2,12E+06	2,12E+06	2,13E+06		
<i>E. faecalis</i> (VRE)	1,88E+06	1,88E+06	1,90E+06		
<i>E. faecium</i>	1,72E+06	1,17E+06	1,28E+06		
<i>A. baumannii</i>	4,83E+05	5,49E+05	3,27E+05		
<i>C. albicans</i>	4,00E+05	1,12E+06			
CMV	2,08E+05				

[00118] As tabelas acima ilustram a remoção e a concentração de 14 patógenos diferentes com o uso dos métodos revelados no presente documento. Por exemplo, conforme é mostrado na Tabela 1, uma amostra de MRSA tem uma concentração inicial de  $1,21 \times 10^5$  CFU/ml. A Tabela 1 mostra várias eficácias dos adsorvatos da presente invenção. Após uma passagem ou passagens repetidas sobre uma coluna que tem heparina, manose, microesfera não protegida (PEI), uma mis-

tura de heparina/manose ou heparina/manose e PEI, as concentrações finais de cada amostra foram medidas, registradas e tabuladas.

[00119] As amostras foram passadas repetidamente sobre as colunas de uma forma interativa. As amostras podem ser passadas múltiplas vezes a cada vez, reduzindo as concentrações bacterianas na amostra e concentrando as bactérias ou patógeno no meio.

[00120] Uma quantidade significativa de patógeno é separada da amostra com o uso do meio de adsorção. A Tabela 2 é uma tabela de sumário que relata a remoção de patógenos com o uso de vários meios. Após o patógeno ser concentrado na coluna de meio, o mesmo pode ser liberado da coluna, e sua presença e identidade podem ser determinadas. O patógeno pode ser concentrado aplicando-se um volume de tampão de eluição que é menor que o volume de amostra inicial. Além disso, o método pode ser usado para remover células e restos da amostra de sangue que podem interferir nos métodos padrão de detecção de patógeno, tais como ensaios colorimétricos, imunoenaios, ELISAs, ensaios baseados em PCR e similares.

[00121] Embora a invenção supracitada tenha sido descrita em alguns detalhes a título de ilustração e exemplo para propósitos de clareza de entendimento, um elemento versado na técnica perceberá que determinadas alterações e modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações anexas. Adicionalmente, cada referência fornecida no presente documento está incorporada em sua totalidade a título de referência na mesma extensão como se cada referência fosse individualmente incorporada a título de referência.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método *in vitro* para concentrar patógenos infecciosos presentes em uma amostra biológica obtida a partir de um indivíduo sob suspeita de estar infectado com os referidos patógenos, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) colocar a amostra biológica obtida a partir do indivíduo em contato com um meio de adsorção sob condições para formar um complexo aderente que compreende o meio de adsorção e os referidos patógenos, em que o meio de adsorção é um substrato sólido de alta área superficial que tem pelo menos um adsorvente de polissacarídeo fixado na superfície do mesmo por ligação de ponto de extremidade;

(b) separar o complexo aderente dos componentes da amostra que não estão incluídos no complexo mantendo, ao mesmo tempo, o complexo;

(c) lavar o complexo aderente com um tampão de lavagem;

e

(d) coletar os patógenos do complexo aderente aplicando-se um tampão de eluição ao complexo, concentrando, assim, os patógenos infecciosos em um eluente; ou alternativamente,

(i) colocar a amostra biológica obtida a partir do indivíduo em contato com um meio de adsorção para formar um complexo aderente que compreende um meio de adsorção e um patógeno presente na amostra;

(ii) determinar a presença do complexo aderente por detecção de uma alteração física no meio de adsorção; e

(iii) prever que o indivíduo está infectado pelo patógeno infeccioso com base na alteração física no meio de adsorção em comparação a um meio de adsorção de referência que foi colocado em contato com uma amostra controle.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o tampão de lavagem é uma solução salina.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o tampão de eluição é uma solução salina de alta força iônica ou hipertônica.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é selecionada dentre o grupo que consiste em sangue total, soro, plasma, urina, fezes, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavagem bronquial, outro fluido corporal e combinações dos mesmos.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um adsorvente de polissacarídeo está ligado à superfície do substrato sólido por ligação de ponto de extremidade.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido substrato sólido compreende uma pluralidade de microesferas de polímero rígidas.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a referida pluralidade de microesferas de polímero rígidas é de microesferas de polietileno rígidas.

8. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que pelo menos um adsorvente de polissacarídeo é um membro selecionado dentre o grupo que consiste em heparina, sulfato de heparano, manose, sulfato de dextrano, ácido hialurônico, ácido salicílico, quitosano e uma combinação dos mesmos.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os referidos patógenos são selecionados dentre o grupo que consiste em *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, vírus Ebola (EBOV), filovírus, Flaviviridae, *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, bactérias

*enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (CRE), um patógeno produtor de ESBL, bactérias *enterococci* resistentes à vancomicina (VRE), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, citomegalovírus (CMV), Adenovírus, vírus do herpes simples 1 (HSV1), vírus do herpes simples 2 (HSV2) e qualquer combinação dos mesmos.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda detectar patógenos infecciosos isolados.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas (a) e (b) reduzem as células sanguíneas da amostra.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende prever se o indivíduo tem malária com base na alteração física no meio de adsorção em comparação a um meio de adsorção de referência que foi colocado em contato com uma amostra controle.

13. Concentrador para uso em conformidade com o método, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende um recipiente preenchido com meio de adsorção, um êmbolo e uma agulha.

14. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende:

um concentrador; e

embalagem para antes e depois do uso;

sendo que o concentrador compreende:

(a) uma porção de recipiente cilíndrico oco com adsorvato contido no mesmo, em que uma extremidade termina em um tubo de saída de um diâmetro menor que o diâmetro da porção de recipiente cilíndrico, sendo que o meio de adsorção é um substrato sólido de

alta área superficial que apresenta pelo menos um adsorvente de polissacarídeo fixado na superfície do mesmo por ligação de ponto de extremidade;

(b) uma agulha hipodérmica oca que se comunica com o tubo de saída da referida porção de recipiente;

(c) um êmbolo que compreende um material elastomérico disposto no interior e adaptado para movimento recíproco dentro do referido recipiente cilíndrico;

(d) meio de haste ligado ao referido êmbolo e que se estende para fora da extremidade da dita porção de recipiente oposta ao tubo de saída e operacional para conferir movimento recíproco ao referido êmbolo em direção a e na direção oposta ao tubo de saída da referida porção de recipiente; e

(f) um reservatório opcional com uma vedação rompível, disposto entre o tubo de saída e o adsorvato.



1/1

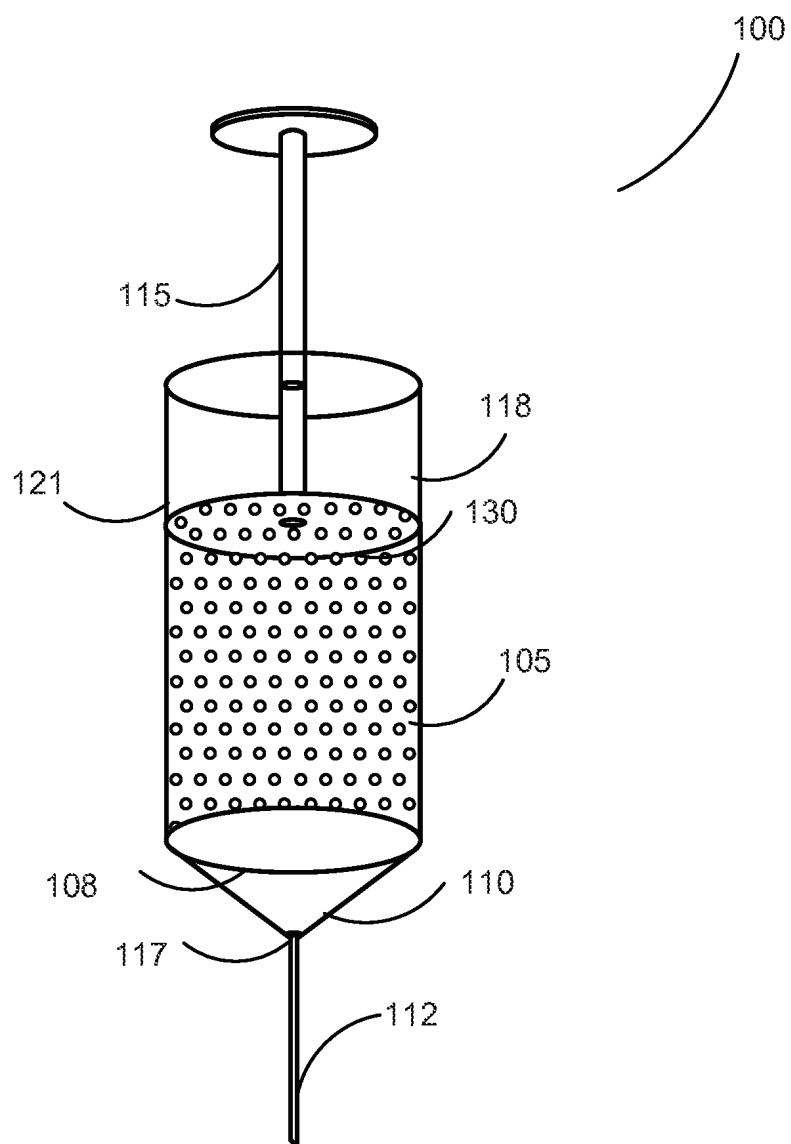


FIG. 1