



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

(21) BR 102017027176-5 A2



(22) Data do Depósito: 15/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 02/07/2019

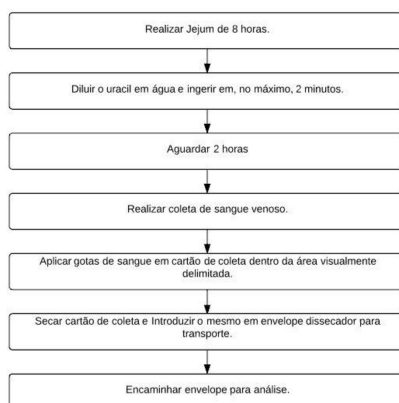
(54) **Título:** KIT E MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD A PARTIR DE SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/50; G01N 33/573.

(71) **Depositante(es):** ASSOCIAÇÃO PRÓ ENSINO SUPERIOR EM NOVO HAMBURGO; HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) **Inventor(es):** RAFAEL LINDEN; MARINA VENZON ANTUNES; GILBERTO SCHWARTSMANN; SUZIANE RAYMUNDO.

(57) **Resumo:** KIT E MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD A PARTIR DE SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL. A presente invenção pertence ao setor tecnológico da farmacologia bioquímica refere-se, mais especificamente, a um kit e método para teste de deficiência da enzima DPD (dihidropirimidina desidrogenase) para pacientes em tratamento com fluoropirimidinas, resultando na estimativa do risco de toxicidade severa causado por fármacos quimioterápicos, por meio de análise de amostra de sangue capilar do paciente após sobrecarga oral de uracil. Tal solução apresenta uma forma de identificar pacientes que apresentam redução da atividade enzimática do DPD. Alternativas já publicadas incluem técnicas bastante complexas, já que fazem uso de baixas temperaturas para transportar as amostras que, geralmente, devem ser coletadas por especialistas. O método ora proposto pode ser executado pelo próprio paciente de maneira segura e ágil através de um kit dotado de uma lanceta descartável e todo o material necessário para a obtenção e remessa da amostra de sangue, que deverá ser impregnada em um cartão de coleta. Após extração por meio de solventes orgânicos, esta é analisada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector seletivo de massas e a concentração de dihidouracil e (...).



KIT E MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD A PARTIR DE SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL

Setor tecnológico da invenção

[01] De uma maneira geral a presente invenção pertence ao setor tecnológico da farmacologia bioquímica e se refere, mais especificamente, a um kit e método para teste de deficiência da enzima DPD (dihidropirimidina desidrogenase) para pacientes em tratamento com fluoropirimidinas, resultando na estimativa do risco de toxicidade severa causada por fármacos quimioterápicos, por meio de análise de amostra de sangue capilar.

Estado da Técnica

[02] O câncer é uma doença crônica de alta incidência e está relacionada entre as cinco principais causas de morte no mundo. Atualmente, um conjunto de mais de cem doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo, são caracterizadas como câncer. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de morte.

[03] Pode-se estimar que o câncer é a segunda maior causa de morte quando analisados os números de mortes de pacientes portadores de doenças crônicas. Dentre esse grupo de doenças, entende-se que as neoplasias colorretal, de cabeça e pescoço, de estômago e de mama, são as mais frequentes e apresentam indicação terapêutica neoadjuvante, adjuvante ou paliativa com o antineoplásico 5-fluorouracil (5-FU).

[04] O 5-FU foi introduzido nas práticas terapêuticas em 1957 e continua a ser parte essencial do tratamento de uma variedade de tumores. Esse antineoplásico é um quimioterápico do grupo dos antimetabólicos que interfere na síntese do DNA e RNA por inibição enzimática, que apresenta um tempo de meia vida curto, entre

10 a 20 minutos. Sua depuração total do corpo varia conforme a sua administração, sendo que a enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD) é a principal responsável. Sabe-se que, contudo, pacientes podem apresentar mutações genéticas que levam a não expressão desta enzima, o que pode provocar efeitos adversos graves devido ao acúmulo do fármaco.

[05] Assim sendo, a falha no tratamento de alguns pacientes pode ocorrer devido a apresentação de toxicidade ao 5-FU, que pode estar relacionada com a variabilidade farmacocinética individual de cada paciente. Ou seja, esses distúrbios podem ser causados pelas diferenças na absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco. Pode-se então afirmar que parcela dos pacientes tratados com 5-FU apresentam toxicidades graves, podendo desencadear inclusive quadros mais agravantes, podendo ocasionar mortes tóxicas de pacientes em tratamento, dependendo da dose e do regime infusional recebido.

[06] Estudos atribuem que dentre as principais causas de toxicidades graves e mortes tóxicas de pacientes a deficiência da enzima DPD pode estar relacionada. A partir disso, constata-se que a análise da atividade da enzima DPD pode ser um determinante importante para prever a eficácia e toxicidade do 5-FU. Tal informação pode, ainda, ser útil para individualizar a administração de 5-FU antes da primeira dose, uma vez que esta enzima geneticamente polimórfica controla aproximadamente 80% da eliminação de 5-FU.

[07] Estas reações adversas, devido ao tratamento por quimioterapia, interferem drasticamente na saúde dos pacientes e estima-se que podem aumentar, significativamente, não só os custos hospitalares, mas também os custos com outros medicamentos. Dessa forma, diversas alternativas já foram avaliadas para prever a atividade da enzima DPD antes do início de tratamentos com fármacos da classe das fluoropirimidinas. Dentre esses testes, destaca-se o teste de genotipagem de DYPD (gene codificante da enzima DPD), que auxilia na tomada de decisão quanto ao ajuste da dose a ser administrada ou mesmo a indicação de tratamento farmacológico alternativo. Além disso, pode-se pontuar que a genotipagem dos alelos mais importantes do gene DYPD associada ao marcador

fenotípico, aumenta a sensibilidade e a especificidade da predição de efeitos adversos. Entretanto, embora esse tipo de procedimento permita realizar uma análise genotípica, esta opção ainda é considerada pouco eficaz para identificar os pacientes com atividade enzimática reduzida. Quando empregados testes de genotipagem, verifica-se que apenas 20% dos casos avaliados são identificados, pois podem ocorrer modificações pós-translacionais das proteínas. Ou seja, podem haver modificações químicas de uma cadeia proteica após sua translação, o que interfere, diretamente, no resultado dos referidos testes.

[08] Outras estratégias também já foram propostas, como a determinação de concentrações endógenas plasmática de uracil (U) e seu produto catabólico, formado também pela enzima DPD, dihidrouracil (UH₂), bem como a determinação destes mesmos compostos, após uma dose de sobrecarga oral de uracil, com elevada capacidade preditiva para identificar pacientes com deficiência enzimática. Contudo, as alternativas acima descritas requerem a coleta de amostras de sangue venoso, seguida de centrifugação imediata e congelamento do plasma resultante para transporte e análise procedimental do material recolhido. Tal procedimento se faz necessário devido à instabilidade do uracil e do UH₂ no plasma humano, tornando extremamente complexa a logística associada à sua execução, já que o transporte da amostra deve ser realizado em faixas de temperatura em torno de -20 °C.

[09] Desse modo, as técnicas atualmente disponíveis, baseadas em análises genéticas e na determinação das concentrações endógenas de uracil e dihidrouracil, embora sejam amplamente empregadas possuem baixa especificidade e sensibilidade para identificar os indivíduos com deficiência da atividade da enzima DPD. Assim pode-se verificar que essas técnicas apresentam claramente limitações de suas aplicações clínicas. A dificuldade do acondicionamento necessário para manter a integridade e para a realização do transporte das amostras é ainda um inconveniente agravante dos métodos atuais.

[010] Uma alternativa proposta pela ODPM (Onco Drug Personalized Medicine) é o uso combinado de dados genéticos e das concentrações endógenas de uracil e

dihidouracil em um algoritmo proprietário para estimativa do risco de toxicidade no tratamento do câncer colorretal com fluoropirimidinas, com especificidade e sensibilidade superiores a 90%. Entretanto, esta abordagem possui custo elevado em função dos múltiplos testes e informações necessárias para o uso do algoritmo proprietário. Além disso, no estudo acima citado, em que é descrito o uso de sobrecarga de uracil para identificação de pacientes com deficiência da atividade da enzima DPD, utilizaram-se doses variáveis de uracil e múltiplas coletas de sangue venoso, o que o torna inviável para utilização em larga escala.

[011] Disto, também existem algumas alternativas que representam o atual estado da técnica e que são descritas em documentos de patentes. Alguns exemplos podem ser observados como no caso da patente de invenção FR1712643 “PREVENTION OF TOXICITIES DUE TO 5-FLUOROURACIL” a qual faz referência a um método “in vitro” para o diagnóstico de sensibilidade aumentada para o 5-fluorouracil, no qual são realizados pelo menos dois testes in vitro. Estes testes são feitos com uma ou mais amostras biológicas, sendo que, pelo menos, um deles é realizado a partir de amostra sanguínea, exigindo o correto acondicionamento em local refrigerado para permitir a logística segura e eficaz das amostras.

[012] Já a patente US20080241068 “SYSTEM AND METHODS FOR IDENTIFYING INDIVIDUALS AT RISK FOR SYSTEMIC FLUOROPYRIMIDINE TOXICITY” a qual descreve métodos e ensaios para a identificação de indivíduos com risco de toxicidade sistêmica de uma substância como fluoropirimidinas, como o 5-FU. A toxicidade ou deficiência da enzima DPD é determinada expondo-se a pele do indivíduo a uma dose de 5-FU, usando um adesivo de pele transdérmico. Uma resposta inflamatória da pele indica o risco do indivíduo para tal toxicidade ou deficiência da enzima. Apesar de ser um teste relativamente simples, o método apresentado é pouco efetivo e dependente do tipo de fluoropirimidinas utilizado no adesivo, ocasionando alto grau de incerteza nos resultados.

[013] Há também a patente US20090197264 “METHOD FOR PREDICTION OF SENSITIVITY TO 5-FLUOROURACIL-TYPE ANTICANCER AGENT” em que é

descrito um método para prever a sensibilidade a agentes anticancerígenos à base de 5-FU, usando o número de cópias do gene DPD como indicador. Além do método, é descrito um kit para utilização na predição das sensibilidades aos agentes anticancerígenos à base de 5-FU, tratando-se de um método lento e complexo devido ao número de etapas necessárias.

[014] Por fim, é possível citar a patente BR 10 2015 018919 2 “KIT E MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLUOROPIRIMIDINAS” que propõe um kit e método não invasivos para teste diagnóstico em pacientes através de amostra visando a determinação do nível de intolerância destes indivíduos a fármacos quimioterápicos da classe das fluoropirimidinas. Contudo, tal método diferencia-se da presente invenção por se tratar de um método de análise salivar e não de análise sanguínea. Além disso, também se diferencia por compreender etapa na qual se deve introduzir um cilindro de algodão na boca do paciente e, após, inserir o cilindro de algodão em seringa descartável, possibilitando considerável risco de contaminação da amostra.

[015] Com isso, a partir dos inconvenientes existentes listados acima, é visível a existência de uma lacuna na criação de um teste diagnóstico prático para determinação da potencial intolerância de um dado paciente ao tratamento com fármacos quimioterápicos a partir de um novo método que vise à melhoria das técnicas de coleta, armazenamento e transporte das amostras biológicas para tal identificação, mitigando os riscos de contaminação da amostra e tornando-se menos desconfortável para o paciente.

Novidades e objetivos da invenção

[016] A presente invenção apresenta uma forma inovadora de identificar os pacientes que apresentam redução da atividade da enzima DPD e, portanto, possuem elevada probabilidade de apresentar efeitos adversos graves devido ao tratamento do câncer com fármacos quimioterápicos da classe das fluoropirimidinas. A presente invenção propõe o uso de uma metodologia que determina os padrões requeridos através de amostras de sangue seco e, dessa

forma, apresenta facilidades, não só na obtenção das amostras, como também na logística, uma vez que amostras secas, usualmente, não requerem refrigeração para transporte.

[017] Alternativamente, a presente invenção permite a coleta em ambiente domiciliar e o transporte das amostras em temperaturas ambiente, com grande estabilidade. Os resultados obtidos, através do método e kit propostos na presente invenção, são comparáveis àqueles encontrados em plasma quando uma adequada conversão matemática é realizada. A solução proposta, portando, permite obter resultados diagnósticos semelhantes ao uso de punções venosas, com maior segurança e conforto para os pacientes.

[018] Desta forma, a presente solução incorpora duas abordagens já descritas de forma isolada, ao combinar o uso de sobrecarga oral de uracil e a análise de amostras colhidas por punção digital, combinando a capacidade preditiva da atividade da DPD com os ganhos de praticidade e logística das amostras secas em papel.

[019] Assim, a invenção conjuga de forma inédita o uso da sobrecarga oral de uracil e a obtenção de amostras através de punção capilar e impregnação em papel (dried blood spots). Desta forma, dispensa a necessidade de profissional especializado para coleta de amostras de sangue e a necessidade de centrifugação e congelamento imediato das amostras. A solução apresentada permite a ampla disseminação da avaliação da atividade da enzima DPD devidos aos ganhos logísticos do uso de quantidades de sangue seco, associada a critérios de avaliação do ensaio já estabelecidos. Considerando que as fluorpirimidinas representam os fármacos quimioterápicos mais utilizados em oncologia, pode-se prever uma ampla aplicação para este teste.

[020] Portanto, resumidamente, com o objetivo de sanar as falhas do estado atual da técnica destacadas acima, a presente invenção visa propor uma solução para o problema principal relacionado aos elevados custos dos procedimentos para a detecção da redução na atividade da enzima DPD, através de um método de

simples execução no qual o próprio paciente pode obter um resultado confiável sem a necessidade de técnicos para a aplicação do mesmo.

Descrição dos desenhos anexos

[021] A fim de que a presente invenção seja plenamente compreendida e levada à prática por qualquer técnico deste setor tecnológico, a mesma será descrita de forma clara, concisa e suficiente, tendo como base os desenhos anexos, que a ilustram e subsidiam abaixo listados:

[022] **Figura 1** representa o diagrama de blocos das etapas de coleta de sangue capilar do método proposto na presente intenção, evidenciando que o mesmo pode ser executado pelo próprio paciente.

[023] **Figura 2** representa o diagrama de blocos das etapas do método para teste de deficiência da enzima DPD para pacientes em tratamento com fluoropirimidinas.

[024] **Figura 3** representa o cartão de aplicação das amostras, evidenciando o local onde elas devem ser inseridas.

Descrição detalhada da invenção

[025] A presente invenção propõe um kit composto de materiais que permitem a coleta e o armazenamento das amostras biológicas dos pacientes. Além disso, a presente invenção propõe um método de diagnóstico através do acesso a amostras de sangue secas de pacientes.

[026] O kit para teste de deficiência da enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD) com sobrecarga de uracil, que compõe a invenção, é compreendido basicamente de embalagem contendo entre 800mg e 1200 mg de uracil, preferencialmente 1000 mg de uracil, lanceta descartável para obtenção da amostra de sangue, cartão de coleta (1) no qual está fixado papel específico para coleta de amostras de fluidos corporais (Whatman 903 ou similar), envelope plástico contendo substância higroscópica para transporte do cartão de coleta (1), suporte plástico para transporte não refrigerado dos componentes do kit, curativo e cartão de instruções de coleta. Nesse caso, dita substancia pode ser exemplificativamente a sílica.

[027] O cartão para coleta (1) trata-se de um suporte no qual está fixado papel específico para coleta de amostras de fluidos corporais (Whatman 903 ou similar), sendo que a dimensão deste papel deve ser suficiente para aplicação de sangue, compreendendo uma área de no mínimo 2 cm x 2 cm. No papel para coleta de amostras de fluidos corporais é opcionalmente impregnado gimeracil, a fim de inibir a atividade da DPD. O gimeracil é impregnado por meio de solução alcoólica (50 mL, 1×10^{-6} M de gimeracil) com posterior evaporação.

[028] A lanceta descartável apresenta lâmina com 0,6 a 2 mm, preferencialmente 0,8 mm e com profundidade de penetração de 1,5 a 2,4 mm, preferencialmente 2,0 mm. Por fim, o kit ora proposto compreende um curativo pós punção, o qual deverá ser utilizado para cobrir a área em que foi realizada a coleta.

[029] Além disso, a presente invenção prevê um método de diagnóstico a ser realizado a partir de amostras de sangue seco. Na figura 1 é apresentado o diagrama de blocos que representa as etapas de dito método para o teste de deficiência da enzima DPD para pacientes em tratamento com fluorpirimidinas através da coleta de uma amostra de material biológico do paciente. O procedimento deve ser iniciado entre 08:00 e 09:00 horas da manhã, após jejum de 8 horas, para garantir a absorção do uracil. Inicialmente, o paciente deve dispersar o conteúdo da embalagem de uracil em pelo menos 200 mL de água, de modo a assegurar a completa absorção, e homogeneizar. O conteúdo do copo deve ser ingerido em no máximo 2 minutos para assegurar concentrações pós-pico em duas horas. O material biológico é coletado do paciente, duas horas após a ingestão da quantidade de uracil, através de uma punção digital por lanceta automática, com obtenção de no mínimo duas gotas de sangue. O sangue obtido é aplicado ao papel específico para coleta de amostras de fluidos corporais (Whatman 903 ou similar), dentro de uma área visualmente delimitada (2). Dessa forma, a amostra biológica é obtida através da compressão da falange punccionada sobre o cartão de coleta (1) nas áreas indicadas (2). Uma vez coletado o material, o cartão de coleta (1) é seco ao ar e introduzido em um envelope contendo material com alta capacidade de absorção de água, tal como sílica gel, para evitar entrada de umidade no cartão no

momento do transporte. A análise da amostra coletada se dá a partir da perfuração do cartão de coleta (1) e consequente extração de um disco (2) impregnado da amostra coletada. A amostra é então extraída do disco (2) com ação de um solvente orgânico, preferencialmente metanol, acetato de etila, isopropanol e suas misturas, e, posteriormente, concentrada através de aquecimento moderado, a temperaturas entre 28°C e 45°C, preferencialmente 40 °C. O aquecimento é mantido durante um período de 10 minutos a 25 minutos, preferencialmente 15 minutos, em condições de vácuo. A amostra concentrada é injetada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector seletivo de massas, com seus componentes separados por eluição em gradiente em uma coluna de cromatografia. As concentrações de uracil e dihidrouracil são determinadas com base na razão das áreas entre dos analitos e do padrão interno para, então, serem comparadas com as concentrações da curva de calibração do cromatógrafo.

[030] Finalmente, o risco de toxicidade do paciente, determinado com base na proporção entre as concentrações de dihidrouracil e uracil (razão UH₂/U), é obtido através de cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas sequencial indicam alto grau de certeza na avaliação dos pacientes de que irão desenvolver toxicidade severa durante o tratamento quimioterápico. Os testes em questão indicam um valor de corte da razão de concentrações UH₂/U em manchas secas de sangue de 0,46. Sendo assim, razões inferiores a 0,46 indicam menor atividade DPD. Tal teste com a utilização das manchas secas de sangue apresenta sensibilidade de 80% e especificidade de 90% para identificar os pacientes com toxicidades de graus III e IV (consideradas graves, cuja detecção possui relevância clínica), em tratamento quimioterápico com fluorpirimidinas. É importante mencionar ainda que na literatura o grau de toxicidade é, geralmente, definido em plasma enquanto, nesse caso, a determinação é ajustada para a razão entre os compostos existentes no sangue total, conforme ensaios realizados pelos inventores.

[031] É importante salientar que as figuras e descrição realizadas não possuem o condão de limitar as formas de execução do conceito inventivo ora proposto, mas

sim de ilustrar e tornar compreensíveis as inovações conceituais reveladas nesta solução. Desse modo, as descrições e imagens devem ser interpretadas de forma ilustrativa e não limitativa, podendo existir outras formas equivalentes ou análogas de implementação do conceito inventivo ora revelado e que não fujam do espectro de proteção delineado na solução proposta.

[032] Tratou-se no presente relatório descritivo de um kit e método inovador para a determinação de pacientes que possuem deficiências na atividade da enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD) após sobrecarga com uracil com o uso de quantidades de sangue seco, dotado de novidade, atividade inventiva, suficiência descritiva, aplicação industrial e, conseqüentemente, revestido de todos os requisitos essenciais para a concessão do privilégio.

REIVINDICAÇÕES

1 - KIT PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD A PARTIR DE SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL o qual compreende cartão de coleta em que está fixado papel específico para coleta de amostras de fluidos corporais, envelope plástico contendo material com alta capacidade de absorção de água, suporte plástico e instruções de uso caracterizado por **caracterizado por** compreender embalagem contendo uracil, lanceta descartável dotada de lâmina com 0,6 a 2,0 mm, com profundidade de penetração variando de 1,5 mm à 2,4 mm.

2 - KIT PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD A PARTIR DE SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL de acordo com reivindicação 1, e ainda **caracterizado pela** lanceta descartável compreender 0,8 mm e profundidade de penetração de 2,0 mm.

3 - KIT PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD A PARTIR DE SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL de acordo com reivindicação 1, e ainda **caracterizado por** compreender curativo pós-punção.

4 - KIT PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD A PARTIR DE SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL de acordo com reivindicação 1, e ainda caracterizado pelo fato de o papel específico para coleta de amostras de fluidos corporais ser o papel Whatman 903 ou similar e apresentar dimensão suficiente para aplicação de pelo menos duas gotas de sangue, compreendendo uma área de no mínimo 2 cm x 2 cm.

5 - KIT PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD A PARTIR DE SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL de acordo com reivindicação 1 e 4, e ainda caracterizado pelo papel específico para coleta de amostras de fluidos ser impregnado com gimeracil.

6 - KIT PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD A PARTIR DE SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL de acordo com reivindicação 1 e 5, e ainda **caracterizado pelo** gimeracil ser impregnado por meio de solução alcoólica de 50 mL, 1×10^{-6} M de gimeracil.

7 - MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLUOROPIRIMIDINAS EMPREGANDO SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL, o qual compreende as seguintes etapas:

- a) Coletar a amostra de material biológico do paciente;
- b) Aplicar pelo menos duas gotas de sangue em cartão de coleta;
- c) Secar a amostra de sangue ao ar;
- d) Introduzir o cartão de coleta (1) em envelope contendo material com alta capacidade de absorção de água para transporte;
- e) Perfurar o cartão de coleta (1) impregnado da amostra coletada;
- f) Extrair o disco (2) impregnado da amostra coletada;
- g) Extrair a amostra do disco (2) com solvente orgânico;
- h) Realizar a concentração do extrato com a elevação da temperatura;
- i) Injetar o extrato concentrado em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector seletivo de massas;
- j) Determinar as concentrações de uracil e dihidrouracil das amostras coletadas;
- k) Determinar o risco de toxicidade severa do paciente

e ainda é **caracterizado por** compreender as seguintes subetapas:

- i. A etapa "a" de coleta da amostra de material biológico do paciente ser realizada através da punção de, pelo menos, uma falange de, pelo menos um dedo, através de lanceta descartável;
- ii. A etapa "b" de aplicação da amostra obtida em cartão de coleta (1) ser realizada comprimindo-se a falange

- puncionada sobre o cartão de coleta (1) nas áreas indicadas (2);
- iii. A etapa “g”, de extrair a amostra do disco (2), ser realizada com solvente orgânico, preferencialmente metanol, acetato de etila, isopropranol e suas misturas;
 - iv. A etapa “h” ocorrer à temperaturas entre 28 °C e 45°C, durante 10 a 25 minutos, em condições de vácuo.

8 - MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLUOROPIRIMIDINAS EMPREGANDO SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL de acordo com reivindicação 7, e ainda **caracterizado pelas** concentrações de uracil e dihidrouracil são determinadas com base na razão das áreas entre dos analitos e do padrão interno.

9 - MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLUOROPIRIMIDINAS EMPREGANDO SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL de acordo com reivindicação 7, e ainda **caracterizado pelo** cartão de coleta ser impregnado com gimeracil.

10 - MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLUOROPIRIMIDINAS EMPREGANDO SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL de acordo com reivindicação 7, e ainda **caracterizado pela** embalagem contendo uracil possuir de 800 a 1200 mg de uracil.

11 - MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLUOROPIRIMIDINAS EMPREGANDO SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL de acordo com reivindicação 7 e ainda **caracterizado por** compreender 1000 mg de uracil.

12 - MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLUOROPIRIMIDINAS EMPREGANDO SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL conforme reivindicação 7, e ainda **caracterizado pelo** material biológico coletado na etapa de coleta de amostra de material biológico do paciente ser o sangue capilar.

13 - MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLUOROPIRIMIDINAS EMPREGANDO SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL conforme reivindicação 7, e ainda **caracterizado pelo** risco de toxicidade do paciente ser determinado com base na proporção entre as concentrações de dihidrouracil e uracil.

14 - MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD PARA PACIENTES EM TRATAMENTO COM FLUOROPIRIMIDINAS EMPREGANDO SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL conforme reivindicação 7, e ainda **caracterizado pelo** pelas etapas “h” e “i” serem associadas à espectrometria de massas sequencial.

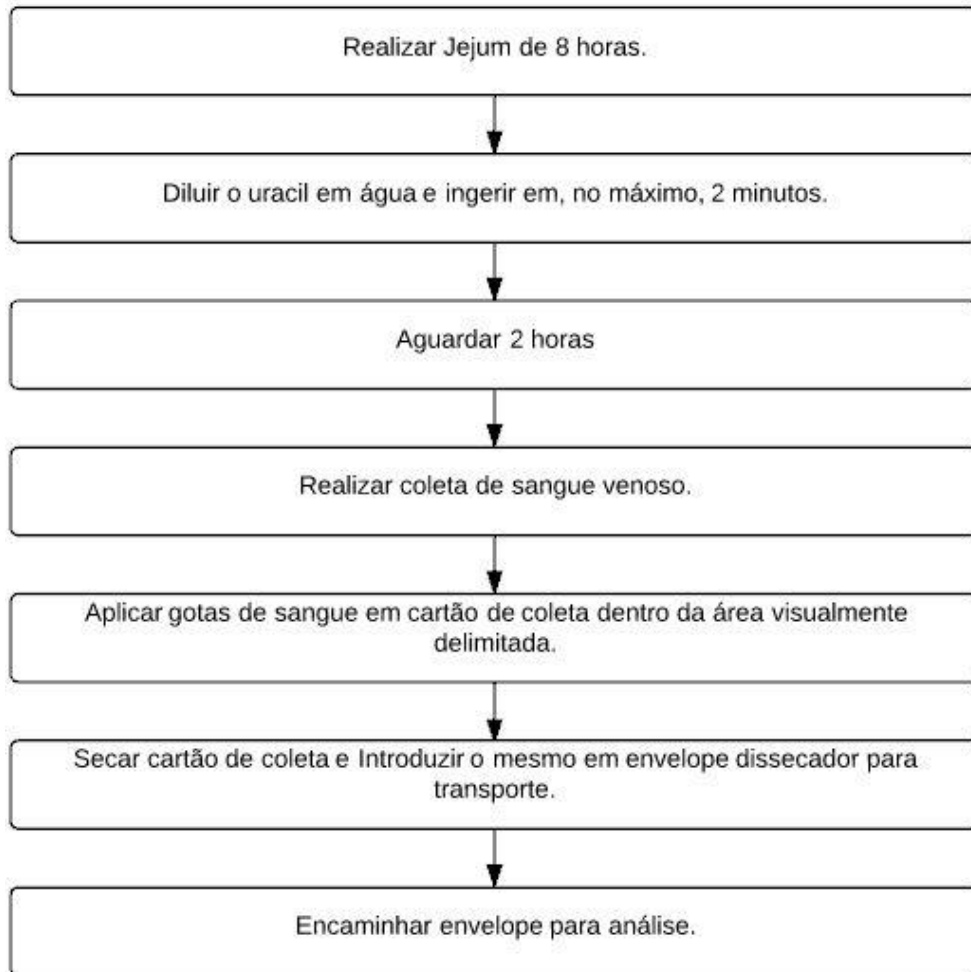


Fig. 1

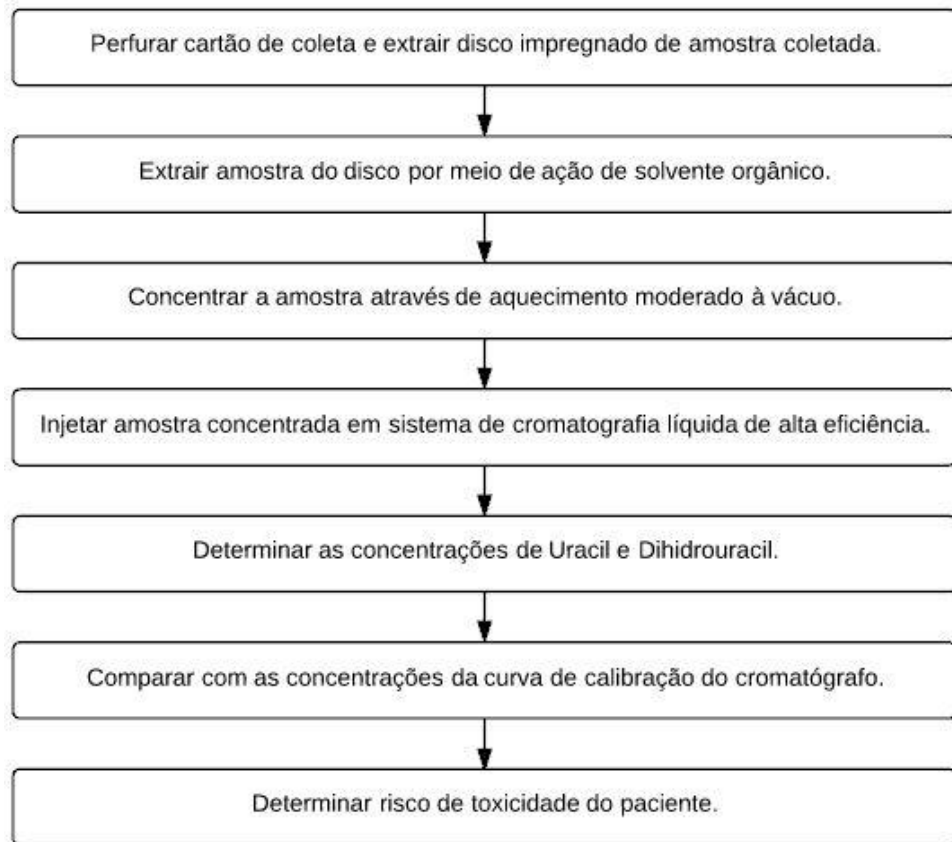


Fig. 2

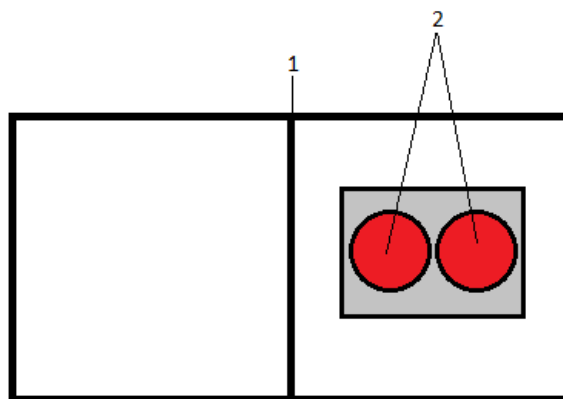


Fig. 3

RESUMO

KIT E MÉTODO PARA TESTE DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA DPD A PARTIR DE SOBRECARGA COM URACIL E COLETA DE SANGUE SECO EM PAPEL

A presente invenção pertence ao setor tecnológico da farmacologia bioquímica refere-se, mais especificamente, a um kit e método para teste de deficiência da enzima DPD (dihidropirimidina desidrogenase) para pacientes em tratamento com fluoropirimidinas, resultando na estimativa do risco de toxicidade severa causado por fármacos quimioterápicos, por meio de análise de amostra de sangue capilar do paciente após sobrecarga oral de uracil. Tal solução apresenta uma forma de identificar pacientes que apresentam redução da atividade enzimática do DPD. Alternativas já publicadas incluem técnicas bastante complexas, já que fazem uso de baixas temperaturas para transportar as amostras que, geralmente, devem ser coletadas por especialistas. O método ora proposto pode ser executado pelo próprio paciente de maneira segura e ágil através de um kit dotado de uma lanceta descartável e todo o material necessário para a obtenção e remessa da amostra de sangue, que deverá ser impregnada em um cartão de coleta. Após extração por meio de solventes orgânicos, esta é analisada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector seletivo de massas e a concentração de dihidrouracil e uracil presentes no sangue são determinados. O risco de toxicidade do paciente é fornecido com base na proporção entre as concentrações.