



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020024380-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102020024380-2

(22) Data do Depósito: 30/11/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 24/08/2021

(51) Classificação Internacional: C07K 4/02; G01N 33/569; A61K 39/215; A61P 31/14.

(54) Título: PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.129 PARA IMUNODETECÇÃO DE ANTICORPOS IGM, IGA E IGG CONTRA COVID-19

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2O ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira; IMUNOVA ANÁLISES BIOLÓGICAS LTDA, Pessoa Jurídica. CGC/CPF: 13933224000106. Endereço: RUA IMACULADA CONCEIÇÃO, 1430, TECNOPARQUE, BLOCO 2 - PRADO VELHO, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80215-182, Brasileira

(72) Inventor: VANETE THOMAZ SOCCOL; CARLOS RICARDO SOCCOL; MANUEL HOSPINAL SANTIANI; RAPHAEL APARECIDO BOSCHERO; JEAN MICHEL DELA VEDOVA COSTA; GABRIELA DO NASCIMENTO FERREIRA; ELIEZER LUCAS PIRES RAMOS; BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO; MAX INGBERMAN; ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI.

Código de Controle: 2A11193CA03038E7 99AC9EC6D7973487

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 30/11/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 24/05/2022

Assinado digitalmente por:
Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.129 PARA IMUNODETECÇÃO DE ANTICORPOS IGM, IGA E IGG CONTRA COVID-19

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção trata de um novo antígeno peptídico imunorreativo com o soro de indivíduos infectados pelo vírus da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2). Reivindica-se a sua aplicação para diagnóstico imunológico da COVID-19. A invenção contempla ainda um ensaio imuno-enzimáticos indireto (ELISAI) empregando o peptídeo sintético mimético como antígeno para detecção de Imunoglobulinas Totais (IgM, IgG e IgA). O ensaio permite discriminar eficientemente indivíduos que foram infectados pelo vírus dos que não foram, de modo rápido e de baixo custo.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. A doença do coronavírus (COVID-19) é uma doença causada pelo vírus da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2). Os primeiros relatos da doença surgiram em dezembro de 2019 na cidade chinesa de Wuhan, e a doença se espalhou rapidamente pelo mundo, recebendo o status de pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de Março de 2020. Até 4 de novembro de 2020, foram confirmados mais de 47 milhões de casos, distribuídos em 187 países e 200 territórios, dentre os quais mais de 1,2 milhões resultaram em óbitos (WHO, World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. 2020. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em 04/11/2020). No Brasil, o Ministério da Saúde confirmou mais de 5,5 milhões de casos e mais de 160 mil óbitos até a mesma data. O país é o terceiro com maior número de casos da doença, ficando atrás somente dos Estados Unidos (9,1 milhões) e da Índia (8,3 milhões) (BRASIL. COVID-19: Painel Coronavírus.

Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>, acesso em 04/11/2020).

[03]. O vírus SARS-CoV-2 é uma nova cepa de coronavírus que não havia sido previamente identificada em humanos. Pode ter surgido do ciclo zoonótico e se espalhado rapidamente pela transmissão de humano para humano (CHAN, Jasper Fuk-Woo et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 514-523, 2020). A transmissão do vírus entre humanos ocorre da mesma maneira que o resfriado e a gripe comum. Dá-se por meio do contato próximo com um indivíduo infectado que produz gotículas respiratórias ao tossir ou espirrar contendo o vírus. Estas pequenas gotículas deixadas no ar podem conter o vírus, e uma pessoa que as inala ou toca em superfícies infectadas também pode se infectar (GHINAI, Isaac et al. First known person-to-person transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in the USA. *The Lancet*, 2020).

[04]. A infecção viral causada pelo SARS-CoV-2 tem como alvo principal o sistema respiratório. Durante este processo, a proteína Spike (S) presente na membrana do vírus se liga ao receptor da enzima conversora de angiotensina humana (ACE-2), permitindo a internalização do vírus nas células. A maioria das infecções causadas por SAR-CoV-2 são leves (em aproximadamente 80%), e com um período de recuperação normal de duas semanas. Os sintomas mais comuns são febre (83-98%), seguido por fadiga (70%) e tosse seca (59%). Todavia, os casos graves de infecção progridem para pneumonia, síndrome respiratória aguda grave, insuficiência renal e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), sendo potencialmente fatal. Além disso, comorbidades subjacentes e idade avançada são fatores de risco para a COVID-19, uma vez que dificultam a recuperação e

aumentam a probabilidade de fenecimento (GUAN, Wei-jie et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England journal of medicine*, v. 382, n. 18, p. 1708-1720, 2020; LI, Xiaowei et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020).

[05.] Apesar dos esforços mundiais, até o momento ainda não existe tratamento ou vacina para a COVID-19. Portanto, o combate à pandemia se dá por medidas de prevenção do contágio e controle da transmissão. A identificação de casos ativos permite o isolamento precoce dos doentes, prevenindo uma maior disseminação da doença, e conseqüentemente diminuindo o número de casos e mortes. Neste sentido, a testagem em massa é uma ferramenta essencial para controle da pandemia, tendo em vista que permite a identificação de indivíduos infectados, e possibilita às autoridades mapearem as regiões com focos da doença, e assim tomarem medidas para conter sua propagação (LEE, Seulki; YEO, Jungwon; NA, Chongmin. Learning From the Past: Distributed Cognition and Crisis Management Capabilities for Tackling COVID-19. *The American Review of Public Administration*, v. 50, n. 6-7, p. 729-735, 2020).

[06.] No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabeleceu por meio da resolução RDC 348/2020 regras extraordinárias para agilizar o registro de exames para detecção da COVID-19, com propósito de viabilizar produtos que possam ser utilizados no enfrentamento da pandemia. A resolução foi publicada em 17 de Março de 2020 e dois dias depois, foram aprovados os primeiros oito testes de diagnóstico para a doença (LAUREANO, Ana Flávia Santarine; RIBOLDI, Márcia. The different tests for the diagnosis of COVID-19-A review in Brazil so far. *JBRA assisted reproduction*, v. 24, n. 3, p. 340, 2020). Até 4 de novembro de 2020, foram realizados mais de 21 milhões de testes para COVID-19 no Brasil, resultando em uma razão de

aproximadamente 102 mil testes por milhão de habitante. Apesar disso, a demanda por testes continua alta e sem perspectiva de redução (Worldometer. Worldometer's COVID-19 data. 2020. Disponível em: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>. Acesso em: 04/10/2020).

[07]. Os testes de diagnóstico para COVID-19 auxiliam os profissionais da saúde durante a fase de prognose, e servem como exames auxiliares confirmatórios. Isto ocorre, pois é difícil diagnosticar a doença baseando-se somente no histórico de exposição do paciente e nas suas manifestações clínicas. Os sintomas são similares as de pacientes acometidos por outras doenças respiratórias, e um grande número de infectados podem ser assintomáticos. Desta forma, a decisão pelo diagnóstico de um indivíduo deve ser baseada em fatores epidemiológicos e clínicos que estão ligados a uma avaliação da probabilidade de infecção. Para confirmar o diagnóstico são necessários exames auxiliares. Os mais comuns são os testes moleculares, por imagem e sorológicos, que podem ser aplicados isoladamente ou ainda em conjunto, provendo mais evidências para fortalecer o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2.

[08]. Os testes moleculares baseiam-se na detecção de RNA viral, sendo a transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) o principal teste molecular para diagnóstico da doença do coronavírus. Este exame permite indicar a presença do vírus SARS-CoV-2 (por RT-PCR) em amostras coletadas da nasofaringe ou do trato respiratório inferior do indivíduo. Porém, existem alguns gargalos no diagnóstico molecular, como: 1) a variação da carga viral em diferentes locais anatômicos dos pacientes, 2) a variação das sequências virais de RNA, e 3) a degradação da amostra. Estes fatores contribuem para uma elevada taxa de resultados falsos negativos para estes testes. Ademais, a detecção da infecção por RT-qPCR é possível somente durante os primeiros dias de aparecimento dos sintomas, de

modo que o reconhecimento de material genético viral começa a declinar a partir de duas semanas até se tornar indetectável. Deste período em diante, o diagnóstico deve ser feito por técnicas sorológicas (WANG, Yishan et al. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *Journal of medical virology*, v. 92, n. 6, p. 538-539, 2020).

[09]. O diagnóstico por imagem consiste na tomografia computadorizada de tórax (CT). Em indivíduos sintomáticos, o tórax apresenta opacidades bilaterais, e as lesões observadas envolvem predominantemente os lobos inferiores bilaterais com distribuição periférica. A CT é utilizada também para acompanhar a progressão da doença e mensurar a gravidade da infecção, uma vez que as manchas observadas refletem o progresso da infecção. Contudo, o diagnóstico por imagem é considerado complementar, pois depende da presença de sintomas, e a sensibilidade desta técnica apresenta grande variabilidade (SHI, Heshui et al. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020).

[003].. Os ensaios sorológicos medem as respostas de anticorpos contra os patógenos em fluidos corporais, especialmente soro ou plasma sanguíneo. Esses ensaios usam plataformas diferentes, incluindo ensaios de interação entre antígeno-anticorpo, como ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISAs), ensaios de fluxo lateral ou ensaios baseados em Western blot. O conjunto de ensaios sorológicos são ferramentas essenciais no manejo de doenças infecciosas, pois permitem, além do diagnóstico, a medição de anticorpos protetores após a vacinação e avaliações de soro prevalência de imunidade em uma população (KRAMMER, Florian; SIMON, Viviana. Serology assays to manage COVID-19. *Science*, v. 368, n. 6495, p. 1060-1061, 2020).

[004].. Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e de fluxo lateral são realizados com antígenos recombinantes, como a proteína Spike (S) ou a proteína do Nucleocapsídeo (N) de SARS-CoV-2, além de variações que utilizam frações destas proteínas. A escolha do antígeno é importante, pois interfere diretamente na sensibilidade (quantos verdadeiros positivos são detectados) e especificidade (a proporção de falsos positivos) do teste (KRAMMER, Florian; SIMON, Viviana. Serology assays to manage COVID-19. *Science*, v. 368, n. 6495, p. 1060-1061, 2020).

[005].. Uma alternativa ao uso de proteínas completas são os peptídeos sintéticos. Eles também podem ser utilizados como antígenos em ensaios sorológicos e podem apresentar alta afinidade antígeno-anticorpo, alta antigenicidade e reduzir ligações inespecíficas. Por esta razão, peptídeos sintéticos vêm sendo explorados como antígenos promissores para diagnósticos sorológicos de diversas doenças. Além disso, a síntese destes peptídeos pode ser realizada em equipamentos automatizados pela técnica de síntese em suporte sólido, sendo um processo reproduzível e ágil (VAN REGENMORTEL, M. H. V. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals*, v. 29, n. 3-4, p. 209-213, 2001; FRANK, Ronald. The SPOT-synthesis technique: synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *Journal of immunological methods*, v. 267, n. 1, p. 13-26, 2002).

[006].. O teste ELISA permite a detecção de diferentes imunoglobulinas, sendo IgA, IgM, e IgG as mais comuns. Estes anticorpos são produzidos em diferentes momentos durante a infecção e isso determina a possibilidade do teste sorológico detectar sua presença. IgM e IgA surgem primeiro, assim, os anticorpos IgM podem ser detectado a partir de 8 dias do aparecimento dos sintomas e desaparecem na sétima semana. Por outro lado, a detecção de

anticorpos IgG começa a partir de duas semanas, mas persiste por mais de sete semanas. Considerando a soroconversão de IgG relativamente lenta, os ensaios de IgA e IgM são úteis no diagnóstico de fase aguda da doença. Além disso, é possível realizar o teste ELISA exclusivamente para cada anticorpo, ou também realizar um ensaio de Ig Total, que indica a presença de IgM, IgA e IgG concomitantemente (SETHURAMAN, N.; JEREMIAH, S. S.; RYO, A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *Jama*, 2020; JÄÄSKELÄINEN, Anne J. et al. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples. *Eurosurveillance*, v. 25, n. 18, p. 2000603, 2020).

[007].. O Brasil importa naturalmente uma grande quantidade de insumos, equipamentos e tecnologias do exterior, porém durante a pandemia de coronavírus vivida em 2020, a demanda por estes itens no mercado internacional cresceu em todo o globo. Por esta razão, existe uma disputa internacional pela compra de itens essenciais para o combate à pandemia. Isto leva ao aumento de preços e até a falta de itens para atender todos os países. Como o Brasil depende destes insumos e tecnologias estrangeiros para garantir a saúde da população, o país fica sujeito às variações de preços do mercado internacional. E, também fica submisso aos interesses dos países detentores das mercadorias. Neste sentido, tendo em vista o cenário de pandemia instaurada no país, são necessários grandes esforços para prover soluções tecnológicas que permitam a redução do número de casos e óbitos, bem como garantir maior autonomia do país em relação aos itens importados.

[008].. A presente invenção versa sobre um peptídeo sintético mimético, imunorreativo com soros de indivíduos infectados com SARS-CoV-2, que pode ser utilizado como antígeno em imunoenaios. Uma vez que a COVID-19 foi identificada em humanos,

pela primeira vez no final de 2019, poucas soluções tecnológicas foram publicadas em documentos patentários até o presente momento.

[009].. Uma busca por métodos de diagnósticos de COVID-19 mostrou invenções que tratam de testes moleculares para a doença, como as patentes CN111118228A; CN111118228B e CN111197112A. Além disso, também foram encontrados testes do tipo imunocromatografia, como nas patentes CN111024954A; CN111060691A e CN111426830A.

[010].. Para testes do tipo ELISA de COVID-19 foram encontradas patentes que utilizavam proteínas recombinantes como antígeno. As patentes US2016376321A, US8541003B2 descrevem o uso da proteína S como antígeno. Já a patente CN111647055A descreve o uso da proteína N como antígeno. Além disso, a patente CN111638332A descreve um teste ELISA para detectar anticorpos IgM, IgA e IgG utilizando como antígeno uma proteína recombinante composta das proteínas S e N. Ademais, a patente CN111518202A descreve o uso de anticorpos do coronavírus para diagnóstico da doença por teste ELISA.

[011].. No tocante ao uso de peptídeos como antígeno em ensaios ELISA, existem trabalhos para outras doenças como a patente BR00221103624550 para diagnóstico de hanseníase, BR1020150177240 e BR 1020120335522 para diagnóstico de leishmaniose, e BR1020150018070 para diagnóstico de artrite reumatoide e artrite idiopática juvenil.

[012].. Deste modo, tendo em vista as limitações das técnicas moleculares e por imagem para diagnóstico de COVID-19, os testes sorológicos, mais especificamente utilizando antígenos peptídicos, se torna uma opção original e promissora, especialmente frente ao cenário de pandemia.

Descrição da abordagem do problema técnico

[013].. A presente inversão trata de um peptídeo sintético que contém uma sequência de aminoácidos da proteína S de SARS-CoV-2, acrescido de outros aminoácidos para conferir mais hidrofiliabilidade à cadeia. Portanto, não corresponde a uma sequência natural. Além disso, o peptídeo é altamente imunorreativo como o soro de indivíduos infectados pelo vírus e pode ser utilizado para imunodeteção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 dos isotipos IgM, IgG e IgA.

[014].. A imunodeteção poderá ser realizada de diversos modos, através de testes ELISA, Western Blotting e imunoeletróquímica, que são rotineiramente utilizados para diagnóstico laboratorial. Mas também através de outras plataformas de detecção, utilizando fluidos corporais como saliva, urina, soro ou plasma sanguíneo. Os testes sorológicos do tipo ELISA apresentam as vantagens de não necessitar de equipamentos sofisticados, de serem passíveis de automação, e de serem relativamente rápidos.

[015].. A síntese de peptídeos também pode ser feita em equipamentos automatizados, o que permite a produção de antígeno rapidamente e em larga escala. Além disso, peptídeos apresentam potencial antigênico de poucos, ou apenas um epítipo, e esta restrição de epítipos, disponíveis para a interação antígeno-anticorpo, pode oferecer uma vantagem de especificidade ao teste. Deste modo, peptídeos sintéticos representam uma alternativa viável para substituir proteínas recombinantes em imunoenaios.

[016].. Além disso, o fato de o peptídeo ser reativo com os isotipos IgM, IgG e IgA, permite que este seja utilizado para diagnóstico em diferentes fases da infecção. Isto ocorre, tendo em vista que IgM e IgA são úteis para diagnóstico durante a fase aguda da doença, enquanto que IgG será detectado mesmo havendo decorrido um longo período pós-infecção.

[017].. Neste contexto, a presente invenção apresenta um novo antígeno peptídico, que pode ser produzido rapidamente e em larga escala, que pode ser utilizado em uma plataforma rápida de testagem de COVID-19, e que pode ser utilizado em diferentes fases da infecção. Sendo assim, é uma alternativa simples, que viabiliza economicamente a testagem em massa, e assim auxilia no controle da pandemia de coronavírus.

Descrição detalhada da Invenção

[018].. A presente inversão propõe o uso de um peptídeo sintético que pode ser utilizado como antígeno para diagnóstico sorológico de COVID-19. O antígeno apresentado nesta invenção se trata do peptídeo sintético P.SC2.S.129 de sequência de aminoácidos SEQ ID N°1. Este peptídeo é caracterizado por conter uma sequência base de aminoácidos da proteína S de SARS-CoV-2 (QIG55994). Outros aminoácidos foram acrescentados a esta sequência base, com o objetivo conferir maior estabilidade físico-química e hidrofiliabilidade à molécula. Deste modo, a SEQ ID N° 1 não corresponde a uma sequência natural e é altamente imunorreativo com os isotipos IgM, IgG e IgA, podendo ser utilizado para diagnóstico tanto na fase aguda, ou mesmo havendo decorrido algumas semanas da infecção.

[019].. O peptídeo P.SC2.S.129 foi primeiramente engenheirado e sintetizado em membrana, através da técnica de SPOT-synthesis, e em seguida foi testado contra um pool de soros positivos e negativos, mais detalhes no Exemplo 1. Os soros utilizados são provenientes de pacientes confirmados com COVID-19 pelo exame de RT-qPCR, e o uso dos soros foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) n° 3.954.835.

[020].. Em seguida, o peptídeo foi sintetizado em equipamento automatizado MultiPep RS (Intavis Bioanalytical

Instruments) pela técnica de síntese em suporte sólido utilizando aminoácidos com grupos de proteção Fmoc. Após síntese, o peptídeo foi purificado com solvente éter terc-butil-metil. Em seguida foi congelado em freezer a -80°C e passou por um processo de liofilização. O objetivo desta etapa é de obter o peptídeo em estado sólido, para que pudesse ser posteriormente resuspenso em um volume menor de água ultrapura, gerando uma solução concentrada do peptídeo. Ao final, a solução concentrada foi quantificada utilizando kit Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific).

[021].. Além disso, a presente invenção também propõe um método de uso do peptídeo P.SC2.S.129 para diagnóstico sorológico do tipo ELISA de COVID-19. Primeiramente, o peptídeo é diluído em uma solução de revestimento (coating) e em seguida imobilizado em suporte sólido do tipo microplacas para ELISA (Greiner Bio-one). Logo após, são adicionadas amostras de fluido biológico, e caso as amostras contenham anticorpos anti-SARS-CoV-2, estes anticorpos se ligarão aos antígenos imobilizados através da interação anticorpos-anticorpo. Posteriormente, são adicionados anticorpos anti-human Ig Total (Thermofisher Scientific), que interagem com os isotipos IgM, IgA e IgG humanos e são conjugadas com uma enzima, como por exemplo a enzyme horseradish peroxidase (HRP). Por fim, é adicionada solução de revelação do tipo OPD solution (o-phenylenediamine dihydrochloride), mas não se restringindo a esta, permitindo assim a detecção da presença dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 na amostra do fluido corporal. Após a leitura da densidade ótica a 492 nm. O método aqui descrito é mais bem detalhado nos exemplos 2 e 3.

[022].. Destaca-se que esta invenção não se limita à metodologia, protocolos e reagentes específicos descritos, enquanto tal, que podem variar. Além disso, o uso do peptídeo P.SC2.S.129 não se restringe ao método aqui proposto, podendo também ser utilizados

para detecção da resposta humoral, detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2, em ensaios como Western Blotting, immunoblotting, imunofluorescência, radioimensaio, microarranjo, teste de fluxo lateral e *Multiantigen Print Immunoassay(MAPIA)*, porém não são limitados a esses. Ademais, a terminologia aqui utilizada tem apenas o propósito de descrever procedimentos particulares e não se destina a limitar o âmbito da presente invenção, que será limitado pelas reivindicações anexas.

[023].. A presente invenção poderá ser mais bem compreendida por meio da descrição dos resultados obtidos. Os procedimentos experimentais envolvidos estão detalhados nos exemplos 1, 2 e 3 que compõem este relatório descritivo.

Exemplo 1: Constatação da reatividade do peptídeo por imunodetecção em membrana

[024].. A sequência de aminoácidos do peptídeo SEQ ID N° 1 foi construída pela união de uma região base proveniente da proteína S de SARS-CoV-2 (QIG55994), com outros aminoácidos para conferir características específicas de estabilidade e hidrofiliçidade. O peptídeo foi então sintetizado imobilizado em membrana de celulose modificada “pela técnica de SPOT-synthesis (FRANK, Ronald; OVERWIN, Heike. SPOT synthesis. In: Epitope Mapping Protocols. Humana Press, 1996. p. 149-169). A síntese foi realizada em sintetizador automatizado de peptídeos (RespPep SL, Intavis) utilizando aminoácidos modificados com grupo Fmoc e grupos de proteção de cadeias laterais. Uma vez que o peptídeo encontra-se acoplado à membrana, ele pode ser utilizado em ensaios como Western Blotting ou imunodetecção para confirmar que o peptídeo tem interação com anticorpos específicos para SARS-CoV-2 presentes em amostras biológicas.

[025].. Após a síntese do peptídeo P.SC2.S.129 imobilizado em membrana, foi realizado um teste de imunodeteccção utilizando soros de indivíduos acometidos com COVID-19 e soros de indivíduos não infectados (Figura1). A primeira etapa da imunodeteccção é a incubação da membrana em metanol, a temperatura ambiente por 2 min, seguida de lavagem. Entre cada etapa é realizada uma lavagem com solução tampão TBS-T (NaCl, KCl, Tris(hydroxymethyl)aminomethane e Tween 20 – 0,05%, a pH 7,0.) a temperatura ambiente por 10 min. Em seguida a membrana é bloqueada com solução de bloqueio (caseína hidrofílica 1% m/v, sacarose 0,5% m/v, Tween 20 0,1% v/v e TBS) (4°C) sob agitação, durante a noite. A membrana é então submetida à incubação com solução diluída do soro humano a 37 °C por 90 min (diluição variando de 1:100 até 1:400). Em seguida é incubada com solução diluída de anticorpos anti-human-IgG-Biotina (ThermoFisher Scientific) a 37 °C por 60 min (diluição variando de 1:7500 até 1:15000). Por fim, a membrana é incubada em solução diluída de anticorpo conjugado estreptavidina-peroxidase (ThermoFisher Scientific) a 37 °C por 60 min (diluição variando de 1:5000 até 1:12000).

[026].. A etapa final da imunodeteccção é a revelação, que deve ser realizada em câmara escura própria para revelação de filmes. Uma vez acomodada a membrana no cassete de revelação, adiciona-se solução de revelação MTT sobre a membrana e esta é coberta com plástico transparente. Mantém-se por 30 min o cassete de revelação fechado. Caso o soro tenha interagido com o peptídeo, a membrana será marcada após a reação de revelação. No caso do peptídeo P.SC2.S.129, não foi observada imunorreacção com pool de soros negativos, porém ouve imunorreacção frente a um pool de soros positivos, provenientes de indivíduos infectados (Figura1). Isto demonstra

a habilidade do peptídeo de ligar-se a anticorpos específicos da COVID-19.

Exemplo 2: Padronização do teste usando novo antígeno P.SC2.S.129 em ensaio imunoenzimático para detectar anticorpos IgM, IgG e Ig Total

[027].. A avaliação do peptídeo (SEQ ID N° 1) como antígeno específico para SARS-CoV-2 foi realizada pela técnica de ELISA, avaliando se há interação do peptídeo com anticorpos presentes em amostras biológicas de indivíduos infectados pelo vírus SARS-CoV-2. A investigação da afinidade específica para SARS-CoV-2 é observada pela comparação entre a reatividade das amostras de indivíduos positivos e negativos.

[028].. Contudo, as variáveis do teste ELISA podem influenciar na distinção entre resultados positivos e negativos, implicando na necessidade de estabelecer condições ótimas para a reação. Neste contexto, a padronização das condições se deu pela variação dos parâmetros: concentrações do peptídeo, concentração de solução tampão de bloqueio, diluição da amostra, diluição da solução de anticorpo conjugado anti-human-IgM-HRP ou anti-human-IgG-Biotina ou anti-human-Ig Total-HRP e diluição de proteína conjugada neutravidina com peroxidase (somente para o isotipo IgG).

[029].. Para realização do diagnóstico, o novo peptídeo P.SC2.S.203 foi inicialmente sintetizado em equipamento automatizado pela técnica de síntese em suporte sólido. Após síntese, o peptídeo foi purificado com solvente éter terc-butil-metil, para em seguida passar por um processo de liofilização. Posteriormente, o peptídeo foi resuspendido em água ultrapura, gerando uma solução concentrada.

[030].. O ensaio ELISA se inicia com a imobilização do peptídeo em um suporte sólido, ao qual ele se ligar e permanecer

adsorvido. Os suportes sólidos incluem microplacas de 96 ou 384 poços, que podem ser de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno ou poliestireno, mas não se restringindo a estas. A concentração do peptídeo por poço do teste pode variar de 20 até 100 ng.

[031].. Moléculas que não interajam especificamente com o antígeno imobilizado aos suportes são removidas por lavagem com a solução de lavagem (PBS 100 mM, Tween 20 a 0,05%, pH 7,4). Posteriormente, adiciona-se solução de bloqueio (BSA variando de 1 a 5%), mas não se restringindo a esta. Ao final é feita outra lavagem.

[032].. Em seguida, é adicionada ao suporte sólido uma amostra de soro com diluições variando entre 1:100 até 1:400. Estes anticorpos se ligarão a um ou mais peptídeos que apresentem a sequência do peptídeo P.SC2.S.129, imobilizados no suporte sólido. Ao final da etapa é feita a lavagem.

[033].. Em seguida, um anticorpo secundário marcado ou uma proteína conjugada a uma enzima ou marcador são diluídos na solução de incubação (variando de 1:7500 até 1:20000) e adicionados aos poços, onde se ligam aos anticorpos provenientes da amostra biológica. O suporte sólido é então lavado novamente, com solução de lavagem, para a remoção de anticorpos não ligados. Para melhor compreensão da imunorreatividade do peptídeo, foram realizados testes com três anticorpos secundários diferentes, sendo um deles anti-human-IgM-HRP, o segundo anti-human-IgG-Biotina e o último anti-human Total (compreende IgM, IgA e IgG).

[034].. Na próxima etapa é aplicada somente para o teste que utiliza anti-human-IgG-Biotina como anticorpo secundário. Deve-se adicionar estreptavidina-peroxidase, variando a diluição de 1:7500 até 1:20000. Ao final da etapa é feita a lavagem.

[035].. Portanto, o anticorpo primário é aquele proveniente da amostra biológica, que reconhece e se liga ao antígeno, e o

anticorpo secundário reconhece o anticorpo primário. O anticorpo secundário é marcado, proporcionando a detecção do antígeno indiretamente. As marcações nos anticorpos secundários são feitas com isótopos radioativos, enzimas ou fluoróforos (mas não se restringindo a estes). As enzimas fornecem sinal detectável da reação destas com substratos específicos, gerando um produto colorido ou fluorescente ou liberação de luz. Essa enzima pode ser mais especificamente uma peroxidase como a HRP (horseradish peroxidase), mas não se restringindo a esta.

[036].. A etapa final do processo de diagnóstico consiste, portanto na adição de solução de revelação nos poços (no exemplo OPD solution, mas não se restringe a esta), seguida de adição de solução de parada. O sinal emitido após a adição dos substratos enzimáticos pode ser colorimétrico, quimioluminescente ou fluorescente, e a quantificação deste sinal indica a presença ou não de anticorpos anti-COVID-19.

[037].. O sinal obtido para os ensaios com IgM, IgG e Ig Total mostram uma diferença entre um pool de soros negativo e um pool de soros positivos para COVID-19 (Figura 2). Estes resultados indicam a imunorreatividade do peptídeo P.SC2.S.129 frente aos três isotipos de imunoglobulinas presentes nos soros de pacientes infectados, e confirma a possibilidade de ser utilizado em imunoensaios.

Descrição das Figuras:

[038]. Figura 1 – A figura 1 representa a interação antígeno/anticorpo do peptídeo imobilizado em membrana pelo anticorpo presente no soro de pacientes infectados por COVID-19. A) soro negativo, B) soro positivo.

[039]. Figura 2 – Proporção e diferença entre valores de absorbância obtidos na padronização das condições do teste ELISA

utilizando o antígeno P.SC2.S.129 frente a pools de soros positivos e negativos para os isotipos IgM, IgG e Ig Total.

Definições

[040]. Anticorpos, também denominados imunoglobulinas (Ig), são macromoléculas presentes no sangue que atuam como mediadores da imunidade humoral específica. As moléculas de anticorpos se ligam aos antígenos de maneira singular, e mediam diversos mecanismos efetores que servem para eliminar tais antígenos.

[041]. Um antígeno é uma molécula apta a interagir com uma imunoglobulina ou uma célula do sistema imunológico, e epítopo é a menor porção desta molécula onde efetivamente ocorre a interação.

[042]. Os anticorpos são divididos nos isotipos IgM, IgD, IgG, IgE e IgA, de acordo com suas estruturas, propriedades funcionais, forma como são secretados, tempo de meia-vida, e concentrações plasmáticas. (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology. ed. 9. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2017).

REIVINDICAÇÕES

1. PEPTÍDEO caracterizado por compreender a sequência de amino ácidos descritos na Seq ID N° 1(P.SC2.S.129).
2. PEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser utilizado como antígeno para detecção de anticorpos ou outras moléculas ligantes em imunoenaios contra a doença COVID-19.
3. PEPTÍDEO, produzido por via sintética, síntese química, ou recombinante de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizados por detectar moléculas ligantes aos mesmos por ensaios imunológicos, como, por exemplo, testes imunoenzimáticos (tais como ELISA, Western Blot, imunofluorescência, imunohistoquímica, EIA, MEIA e outros), testes por imunoaglutinação, sensores eletroquímicos, ou de qualquer outra forma de detecção relacionada direta ou indiretamente em amostras de fluídos corporais, como sangue, plasma, saliva, urina, não se limitando a estes.
4. PEPTÍDEO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser utilizado como ligante à imunoglobulinas presentes em amostras biológicas como soro, plasma, urina, lágrima, e moléculas envolvidas direta ou indiretamente no processo de autoimunidade.
5. USO DO PEPTÍDEO, conforme definidos nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser usado na preparação de uma composição imunogênica, para estimular ou desestimular o sistema imune humano ou animal contra doenças como COVID-19.
6. COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, caracterizado por compreender um ou uma associação de peptídeos definidos nas reivindicações 1 e 2 e ao menos um adjuvante.

7. MÉTODO ELISA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19 UTILIZANDO COMO ANTÍGENO O PEPTÍDEO, definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender as etapas de:
- a) ligação de anticorpos anti-SARS-CoV-2 de uma amostra de fluido biológico como sangue, soro, plasma, saliva, urina ou lágrima, mas não se limitando a estas, a um ou mais polipeptídeos consistindo das sequências de aminoácidos Seq ID N° 1, ligadas a um suporte sólido;
 - b) contato dos anticorpos do passo (a) com um anticorpo secundário ou uma proteína, conjugado(a) a uma enzima ou a um marcador e que se ligam aos anticorpos do passo (a);
 - c) detecção dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 na amostra supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligados ao dito anticorpo anti-SARS-CoV-2.
8. MÉTODO ELISA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pela realização da etapa (a) ser mediante o uso do peptídeo P.SC2.S.129, na faixa de concentração 20 a 1000 ng, em sua forma original, com modificação em suas extremidades ou na forma de polímeros constituídos de repetições de uma sequência peptídica, podendo ser separadas por qualquer método, incluindo espaçadores ou linkers.
9. MÉTODO ELISA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pela realização da etapa (b) mediante a diluição do anticorpo secundário ou proteína na faixa de proporção de 1:2000 até 1:20000 no tampão de incubação.

DESENHOS

Figura 1

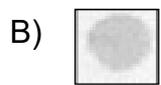
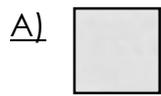


Figura 2

