



**IPI** INSTITUTO  
NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL  
Assinado  
Digitalmente

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

CARTA PATENTE Nº BR 102020024390-0

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 102020024390-0

**(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.132 PARA KIT ELISA DE AVIDEZ NO DIAGNÓSTICO DE 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; ELIEZER LUCAS PIRES RAMOS; MANUEL HOSPINAL SANTIANI; RAPHAEL APARECIDO BOSCHERO; CARLOS RICARDO SOCCOL; JEAN MICHEL DELA VEDOVA COSTA; GABRIELA DO NASCIMENTO FERREIRA; BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO; MAX INGBERMAN.

**Código de Controle:** D2C355F79563F690 EE09141FBAAD0B79

**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.132 PARA KIT ELISA DE AVIDEZ NO DIAGNÓSTICO DE COVID-19**

### Campo da Invenção

[001]. A presente invenção reivindica o peptídeo P.SC2.S.132 para aplicação no diagnóstico sorológico de COVID-19, incluindo: a sequência de aminoácidos do antígeno empregado (peptídeo P.SC2.S.132, SEQ NO 1), e seu uso em método sorológico como o ensaio imunoenzimático (ELISA) de avidéz padronizado para o antígeno. O presente kit de diagnóstico apresenta baixo custo, rápida produção em larga escala e é capaz de distinguir imunidade ativa de indivíduos imunes para COVID-19, permitindo o aperfeiçoamento da reatividade dos testes de diagnóstico e triagem epidemiológica. Este método tem a vantagem de poder datar a infecção por Sars-Cov-2.

### Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. O vírus SARS-CoV-2 foi identificado no final de dezembro de 2019 após sequenciamento metagenômico de amostras pacientes com sintomas de gripe em Wuhan na China. Os dados demonstraram que o vírus fazia parte da família Coronaviridae, posteriormente denominado SARS-CoV-2 e a doença COVID-19. Devido a extensa disseminação do vírus, em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) conferiu estado de pandemia (WU, F., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature, 2020). O SARS-CoV-2 já infectou cerca mais de 48 milhões e matou mais de 1,2 milhões pessoas em todo o mundo (OMS, em 5 de novembro de 2020, disponível em <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>). A mobilidade, resistência do vírus e o estado de portadores assintomáticos têm sido os principais responsáveis pelo aumento rápido e exponencial das incidências de infecções por

COVID-19. Um passo fundamental para retardar a propagação da doença é identificar precocemente pessoas infectadas e impedir a disseminação viral. Foi relatado que o número de reprodução de SARS-CoV-2 é bastante elevado em comparação com outros patógenos, o que favorece sua disseminação em um curto espaço de tempo (LIU, T., HU, J., KANG, M., et al. Transmission Dynamics of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV), SSRN Electronic Journal, 2020). Portadores assintomáticos podem aumentar a transmissão e consequente disseminação da doença de maneira incontrolável se não forem identificados e colocados em quarentena no estágio inicial. Em tal situação, a triagem em massa para a doença torna-se necessária e, portanto, as alternativas de diagnóstico são fortemente recomendadas para impedir a propagação do vírus (KUMAR, R., NAGPAL, S., KAUSHIK, S., et al. COVID-19 diagnostic approaches: different roads to the same destination. VirusDisease. [S.l: s.n.], 2020).

[003]. As abordagens de detecção de SARS-CoV-2 são baseadas na análise de seus sintomas clínicos, juntamente com exames auxiliares. Apesar de haver testes diagnóstico rápidos e sensíveis para COVID-19, estes ainda não são totalmente acessíveis, visto que a infecção já atingiu todo o mundo, inclusive países economicamente emergentes como o Brasil. Há diferentes métodos de diagnóstico disponíveis atualmente, cada um com diferentes graus de especificidade e com base em uma ou múltiplas moléculas alvo de SARS-CoV-2. Esses métodos se baseiam na identificação do RNA do patógeno por Transcrição reversa do RNA do vírus (RT-qPCR) usando um ou mais genes, ou por meio do genoma inteiro através do sequenciamento de nova geração (KUMAR, R., NAGPAL, S., KAUSHIK, S., et al. COVID-19 diagnostic approaches: different roads to the same destination. VirusDisease. [S.l: s.n.], 2020).

[004]. Dentre as metodologias aplicadas para o diagnóstico da COVID-19, os testes moleculares são os mais utilizados para o diagnóstico da infecção ativa ou seja na fase aguda. O PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) da transcrição reversa é amplamente empregado para esse tipo de diagnóstico. Tal técnica se baseia na detecção do RNA do vírus em amostras de fluidos biológicos como saliva e escarro nasal. Todavia, essa técnica apresenta algumas limitações como não detectar baixa carga viral em alguns pacientes, gerando resultados falsos negativos. Pois somente após o oitavo dia de contato com o vírus que ele pode ser detectado pela técnica. Isso ocorre, pois alguns indivíduos conseguem controlar a infecção inicial, eliminando ou impedindo a proliferação viral já no início de contato com o vírus. (PASCARELLA, et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *Journal of Internal Medicine*. 2020). Além disso, dependendo da quantidade, momento e região corpórea onde o material foi coletado pode haver uma concentração viral baixa incapaz de ser detectada por este método. Estima-se que apenas 30 a 50% dos pacientes infectados sejam realmente diagnosticados positivos caso tenham realizado apenas uma coleta para análise por RT-qPCR, mostrando que os demais indivíduos são diagnosticados como negativos (falsos negativos) apesar de apresentarem sintomas característicos da infecção ou com diagnóstico de imagem como tomografia do tórax evidenciando um processo inflamatório pulmonar, (WANG, Y. 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).

[005]. Um método indicativo da doença é por tomografia computadorizada do tórax, empregado principalmente em pacientes sintomáticos. A técnica identifica áreas opacas nos pulmões e é empregada em conjunto de outros métodos após a presença de

sintomas. Apesar de não diagnosticar especificamente a infecção pelo vírus, a tomografia é importante para determinar a gravidade da infecção em pacientes sintomáticos doença, além de acompanhar sua progressão. Contudo, sua sensibilidade é variável dependendo dos estágios da infecção e os sintomas do paciente. (BERNHEIM et al. Chest CT findings in coronavirus disease-19 (COVID- 19): relationship to duration of infection. Radiology. 2020; KANNE, J. P. et al. Essentials for radiologists on COVID-19: an update—radiology scientific expert panel. Radiology. 2020).

[006]. Os testes sorológicos detectam anticorpos produzidos contra antígenos de patógeno e são importantes para a determinar indivíduos imunes, pessoas com baixa dose viral apresentando RT-qPCR falso-negativo e pacientes com notificação tardia. O SARS-CoV-2 induz respostas imunes humorais e celulares. O diagnóstico de COVID-19 visando a resposta imune humoral pode ser vantajoso em várias perspectivas, dentre elas podemos citar a não necessidade de um laboratório de biossegurança nível 3. Desse modo, diferentes técnicas vem sendo empregada no sorodiagnóstico da COVID-19. A quimiluminescência indireta (CLIA) que usa molécula luminescente como marcador, tem ampla faixa dinâmica, alta intensidade de sinal, ausência de emissões interferentes, alta estabilidade de reagentes e capacidade de detectar concentrações moleculares tão baixas quanto  $10^{-21}$ mol, entretanto, apresenta alto custo e adaptação do espaço físico (CINQUANTA, L.; FONTANA, D.E.; BIZZARO, N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? Auto Immun Highlights, v. 8, n.1, 2017). Por outro lado, o imunoensaio de fluxo lateral (LFIA) é simples, portátil, rápido e fácil de interpretar, contudo, é qualitativo e apresenta baixa sensibilidade (WONG, R.; TSE, H. Lateral Flow Immunoassay. Berlin, Germany: Human press part of Springer Science & Business Media; 2008).

[007]. O *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), é uma técnica que se baseia na detecção de antígenos ou anticorpos a partir da atividade de uma enzima. Na aplicação sorológica, esse teste é capaz de detectar a presença de anticorpos específicos em fluidos biológicos, tais como soro, saliva, urina, mas não se limitando a estes. Para tanto, é necessário que antígenos específicos do patógenos sejam aplicados para detecção destes anticorpos. Dentre as vantagens dessa técnica, pode-se citar a facilidade de execução, o tempo e a automação para maior rendimento e após padronização das condições, pode apresentar elevada sensibilidade e especificidade (CARTER, L.J.; GARNER, L.V.; SMOOT, J.W.; et al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Cent Sci*, v.6, n.5, p.591-605, 2020). Essa técnica é amplamente aplicada no diagnóstico de diversas patologias infecciosas, por ser econômica e acessível para os países em desenvolvimento, onde a experiência e a infraestrutura são limitadas e a resposta do sistema de saúde é medida em dias em vez de horas. Além disso, tais testes são recomendados para triagem rápida de indivíduos sintomáticos, vigilância epidemiológica e confirmação de indivíduos que mantiveram contato com pessoas com sintomas de COVID-19 (MEKONNEN, D. et al. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*, e2181, 2020).

[008]. Correspondendo às limitações de recursos, técnicas e de amostra do uso de RT-qPCR, desenvolver um teste sorológico baseado na interação antígeno-anticorpo se torna importante principalmente em epidemias e pandemias. O ELISA vem sendo amplamente empregado para detectar anticorpos (IgM ou IgG) específicos no diagnóstico de COVID-19. Destes, alguns métodos já foram estabelecidos. Entretanto, é fundamental que métodos mais acessíveis

e confiáveis para diferentes populações mundiais sejam desenvolvidos para facilitar, otimizar e tornar acessível o diagnóstico (KUMAR, R., NAGPAL, S., KAUSHIK, S., et al. COVID-19 diagnostic approaches: different roads to the same destination. *VirusDisease*. [S.l: s.n.], 2020). Tais métodos normalmente usam amostras de sangue para detectar os anticorpos contra antígenos virais específicos. Anticorpos do isotipo IgM são produzidos dentro de alguns dias ou meses e atua como primeira linha de defesa ativa, seguido pela produção de anticorpos do isotipo IgG que perdura por um longo período de tempo na corrente sanguínea (GUO, L., REN, L., YANG, S., et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19), *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2020). Embora a detecção de IgM possa indicar uma infecção ativa, a aplicação da detecção desse anticorpo no diagnóstico pode ser questionável, uma vez que IgM pode persistir por longo prazo, além de reagir de forma cruzada mais facilmente com outros vírus devido a especificidade limitada. Ou pode ainda estar envolvida na estimulação inespecífica do sistema imunológico. Consequentemente, o diagnóstico de infecção ativa não pode depender apenas de um resultado positivo do teste de IgM. A determinação da avidéz, ou seja, a afinidade de ligação do anticorpo ao antígeno, especialmente de IgG, é uma ferramenta adicional para confirmar ou infirmar a infecção ativa por um determinado agente infeccioso. Anticorpos IgG de baixa avidéz ocorrem no início de uma infecção e devido as propriedades da imunidade humoral a avidéz aumenta e se torna IgG de alta avidéz em 2–4 meses após a infecção ativa (VAULOUP-FELLOUS, C.; LAZZAROTTO, T.; REVELLO, M.G.; GRANGEOT-KEROS, L. Clinical evaluation of the Roche Elecsys CMV IgG Avidity assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 33, n.8, p. 1365-1369, 2014).

[009]. Outra propriedade importante nos testes sorológicos e a determinação do antígeno a ser aplicado nos ensaios. Antígenos são moléculas capazes de interagir com o anticorpo ou com receptores de linfócitos, célula especializadas em combater especificamente patógenos. Cada antígeno apresenta diferentes epítomos, sendo essa a região de ligação com o anticorpo que muitas vezes são porções peptídicas, ou seja, que apresenta uma sequência de até cerca de 30 aminoácidos (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology. ed. 9. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2017).

[010]. A escolha do antígeno é fundamental para aplicação e desenvolvimento de testes ELISA de qualidade. Para COVID-19, antígenos recombinantes provenientes de duas proteínas virais, *spike* (S) e *nucleocapsid* (N) (CN111239392A) se destacam nos testes de detecção dos anticorpos IgG e IgM (LIU et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based ELISAs for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. Journal of clinical microbiology. 2020). Porém, testes utilizando a proteína S tendem a apresentar maior sensibilidade (KONTOU, P. I. et al. Antibody Tests in Detecting SARS-CoV-2 Infection: A Meta-Analysis. Diagnostics (Basel), v.5, p. 319, 2020). Adicionalmente, antígenos induzindo anticorpos de alta avidéz podem refletir na melhora do diagnóstico a partir da determinação de pessoas com infecção ativa ou com anticorpos protetores. Em um estudo recente foi demonstrado que a proteína viral S em sua forma recombinante leva a produção de anticorpos IgG com alta avidéz cerca de 20 dias após o aparecimento dos sintomas, sendo que os anticorpos IgG de baixa avidéz ou média ocorreram após o 7 dia do aparecimento dos sintomas, demonstrando que essa proteína é um bom alvo para a diferenciação de infecção ativa e geração de imunidade (BENNER, S. E.; PATEL, E. U.; PEKOSZ, O. L. A.; LITTLEFIELD, K.; et al. SARS-CoV-2

Antibody Avidity Responses in COVID-19 Patients and Convalescent Plasma Donors, *The Journal of Infectious Diseases*, , jiaa58, 2020).

[011]. Além de proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos, tem emergido como antígenos promissores para diagnósticos sorológicos de doenças infecciosas. Isso pela capacidade de seleção de peptídeos que sejam altamente antigênicos e imunogênicos com alta afinidade e capacidade de indução de anticorpos. Além disso, dependendo da técnica empregada na síntese, o rendimento é alto e o custo baixo para ser empregado no desenvolvimento de testes de diagnóstico (BR00221103624550) (REGENMORTEL, M. H. V. V. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. *Biologicals*. v. 29. p. 209-213 2001; ALBAN, S.; MOURA, J.; THOMAZ-SOCCOL, V. Uso de peptídeos miméticos de *Mycobacterium leprae* para diagnóstico e vacina. Depositante: Universidade Federal do Paraná. BR00221103624550. Depósito: 03 maio 2011; KOSMATOPOULOS, K. Uso de um peptídeo nativo para a produção de uma composição medicinal, processo para a obtenção in vitro de ctls com elevada avidéz por um peptídeo nativo e kit de vacinação. Depositante: VAXON BIOTECH. PI 0608768-0 B1. Depósito: 09 maio 2006. Concessão: 20 ago. 2019).

[012]. Buscas em bancos de documentos patentários não apresentaram até o momento documentos reivindicando kits de testes sorológicos do tipo ELISA indireto de avidéz empregando peptídeos sintéticos como antígeno para SARS-CoV-2 o que demonstra a originalidade da presente invenção, além da mesma contar com uma sequência artificial original. Os termos de busca "(COVID\* OR SARS-CoV-2 OR coronavirus OR avidity) AND (diagnos\* OR test\* OR avidity) AND (peptid\*)" foram pesquisadas nas plataformas do INPI, Patent Inspiration, EspaceNet e Derwent. Considerando publicações a partir de 2019. Foram encontrados documentos requerendo peptídeos de SARS-CoV-2. Todavia, sem comprovada aplicação direta em kit ELISA indireto de

avidéz (CN111393532A). Os documentos mais similares a esta proposta apresentam inovação empregando múltiplos peptídeos no teste de ELISA indireto para detecção de IgM e IgG (CN111423496A), ou outro teste sorológico (CN111647054-A) (ZHOU, J. et al. New dominant epitope fusion protein comprising N protein dominant epitope peptides, S dominant epitope peptides and E protein dominant epitope peptides, useful in double antibody sandwich in vitro novel coronavirus diagnostic reagent. Depositante: Beijing Diagreat Biotechnology CO LTD. CN111393532-A. Depósito: 26 fev. 2020; LINLIN, B. et al. Polypeptides or combinations thereof for detecting novel coronaviruses. Depositante: Inst Of Laboratory Animal Sciences Chinese Academy Of Medical Sciences. CN111423496B. Depósito: 14 jul. 2020. Concessão: 17 set. 2020; ZHAO, W. et al. New polypeptide useful for preparing reagents for detecting or diagnosing the novel coronavirus SARS-CoV-2. Depositante: Shanghai Xiangyao Biopharma CO LTD. CN111647054-A. Depósito: 12 jun. 2020).

#### Descrição da abordagem do problema técnico

[013]. A infecção por SARS-CoV-2 já alcançou todo o mundo e matou milhões de pessoas em menos de um ano da descrição do vírus. Pela fácil disseminação, o método mais seguro e eficaz para controle da COVID-19 é o isolamento social. Desse modo, o diagnóstico de infecção ativa e de indivíduos imunizados são importantes para desenvolvimento de estratégias de controle epidemiológico. Vista as limitações que as técnicas moleculares apresentam, além de muitas vezes serem de qualidade questionável e alto custo, o desenvolvimento de métodos alternativos são fundamentais, principalmente em países desprivilegiados economicamente.

[014]. O ELISA de avidéz para IgG é empregado para diferenciar infecções aguda e crônica, ou indivíduos com infecção ativa ou que já

passaram pela infecção a partir da afinidade de ligação de anticorpos IgG com o antígeno. Tal método sorológico é altamente empregado em doenças infecciosas tais como, toxoplasmose e mononucleose infecciosa, a fim de investigar uma possível infecção ativa. O ELISA indireto de avidéz de IgG é uma técnica rápida, fácil de execução, reproduzível e de baixo custo, principalmente quando se emprega peptídeos sintéticos como antígenos, por serem de fácil produção, rendimento e escalabilidade.

[015]. A partir dessas informações, essa intenção tem como objetivo apresentar um kit de diagnóstico de IgG de avidéz para COVID-19. Para isso, anticorpos contra o peptídeo sintético P.SC2.S.132 (SEQ ID No. 1) com identidade a um epítipo da proteína S de SARS-CoV-2 é utilizado como antígeno que é uma sequência artificial de alta identidade para o vírus SARS-CoV-2. Para cada teste é utilizado apenas cerca de 10 a 500 ng deste peptídeo o que permite produção em larga escala. O rendimento da síntese pode variar a massa final obtida entre 1 a 480 mg de peptídeo. Tal rendimento reflete na possibilidade de produzir grande quantidade de antígenos a serem empregados em milhões de testes.

[016]. A inovação aqui apresentada é referente ao teste sorológico ELISA indireto de avidéz de IgG com uma sequência peptídica artificial como antígeno. Essa sequência demonstrou diferenciar anticorpos IgG de alta, média e baixa avidéz, determinando assim uma infecção ativa ou indivíduos potencialmente imunizados, sendo uma estratégia de confirmação em casos de IgM e IgG positivos.

#### Descrição detalhada da Invenção

[017]. A presente invenção descreve um kit de diagnóstico sorológicos baseado na avidéz de IgG para a infecção por SARS-CoV-2. O antígeno empregado para detecção desses anticorpos é um

peptídeo sintético artificialmente engenheirado a partir da proteína S do vírus, denominado P.SC2.S.132 (SEQ ID No. 1). Tal antígeno será empregado na técnica de ELISA para determinação da avidéz de anticorpos IgG em amostras biológicas como soro.

[018]. Os exemplos apresentados abaixo demonstram a obtenção do antígeno e sua validação, sem se limitar a esse kit de diagnóstico proposto e seu uso:

Exemplo 1: Obtenção do antígeno P.SC2.S.132 para o Kit de diagnóstico sorológico para COVID-19

[019]. A partir de plataformas de bioinformática a sequência de aminoácidos do peptídeo P.SC2.S.132 (SEQ ID No. 1) foi desenvolvida e avaliada com relação a sua similaridade com sequências derivadas dos organismos SARS-CoV-2 (taxid:2697049), MERS (1335626), H1N1 (taxid:114727) e humanos (taxid:9606). Além disso, a similaridade com outras sequências previamente patenteadas também foi avaliada. A Tabela 1 expõe as análises realizadas na ferramenta BLASTp disponível na plataforma do NCBI, National Center for Biotechnology Information, evidenciando que a identidade variou de 77,8 a 87,5% (ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 1997).

[020]. Tabela 1: Análise de similaridade da sequência artificial SEQ ID No. 1 (peptídeo P.SC2.S.132).

<b>Organismo</b>	<b>Menor E-value</b>	<b>Identidade</b>	<b>Cobertura</b>
<b>SARS-CoV-2</b>	9x10 <sup>-6</sup>	100,00%	83%
<b>MERS</b>	1123	77%	44%
<b>H1N1</b>	19,7	77,78%	38%
<b>Humanos</b>	24,4	87,50%	72%
<b>Patenteados</b>	0,002	80%	83%

[021]. A partir dos valores apresentado na Tabela 1 certifica-se que o peptídeo P.SC2.S.132 apresenta elevada similaridade com o vírus alvo, SARS-CoV-2. Todavia, a cobertura de 83% se dá pelas modificações realizadas na sequência. Desse modo, essa sequência é artificial, não natural, e altamente específica. Além disso, a sequência apresentou baixa similaridade para os organismos MERS, H1N1 e humanos, o que reduz o risco de reatividade cruzada com anticorpos específicos para estes outros organismos. Não houve sequências iguais nas bases de documentos patentários, sendo a de maior similaridade encontrada a sequência 1 do documento patentário US 9884895 (Sequence ID AVY23063.1)(BARIC,R., AGNIHOTHRAM,S. YOUNT,B. Methods and compositions for chimeric coronavirus spike proteins. Depositante: The University of North Carolina at Chapel Hill; Chapel Hill, NC. US 9884895. Depósito: 06 fev. 2018. Concessão: 02 abr. 2018).

[022]. A ferramenta ProtParam-ExPASy foi empregada para avaliar algumas características físico-químicas importantes para o peptídeo P.SC2.S.132 (GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M (ed). The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, 2005) e estão apresentadas na Tabela 2.

[023]. Tabela 2: Predição das características físico-químicas para o peptídeo P.SC2.S.132.

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Massa molecular	1932,37 g/mol
Ponto Isoelétrico teórico	10,05
Fórmula química	C <sub>82</sub> H <sub>150</sub> N <sub>26</sub> O <sub>23</sub> S <sub>2</sub>
Índice GRAVY de hidrofobicidade	-0,950

[024]. A técnica de síntese de peptídeos ancorados em matriz sólida foi aplicada para a síntese do peptídeo P.SC2.S.132 (MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. Journal of the American Chemical Society, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1963.). Foram utilizados sintetizador automatizado MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments) juntamente com aminoácidos modificados com grupos de proteção Fmoc e resina de suporte. Os peptídeos sintetizados foram purificados realizando ciclos de lavagem com éter tert-butil-metil e ressuspendidos em água ultrapura. Foram congelados a -80 °C e liofilizados durante 24 h em equipamento liofilizador Modulyod Freeze Dryer (ThermoFischer). Por fim, o peptídeo foi ressuspendido em solução tampão fosfato-salina pH 7,0 e mantidos em -20 °C até o uso.

[025]. A quantificação de peptídeos foi realizada utilizando o kit Micro BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific) para determinação da concentração na solução diluente.

#### Exemplo 2: Padronização da aplicação do antígeno P.SC2.S.132 em kit e método diagnóstico por teste ELISA de avidéz de IgG

[026]. Após síntese e quantificação do peptídeo P.SC2.S.132, a reatividade deste foi avaliada aplicando o teste ELISA indireto para detecção da avidéz de IgG. Foi investigada a produção e avidéz de anticorpos IgG provenientes de amostras biológicas do soro sanguíneo de indivíduos previamente diagnosticados ou não para COVID-19 (aprovação em comitê de ética Parecer 4.080.417). Para padronização, variou-se a concentração de antígeno, tipo e concentração de solução de bloqueio, diluição de soro, quantidade e tempo de ureia, concentração de anticorpo secundário conjugados com biotina e, por fim, concentração da enzima ligante de biotina. Essas variações tiveram o objetivo de determinar a melhor combinação de condições para

alcançar a maior razão entre valores obtidos entre soros positivos e negativos.

[027]. As concentrações de antígeno variaram dentro da faixa de 10 até 150 ng/poço de reação. Foram empregadas duas soluções de reagentes bloqueio na padronização: caseína (entre 2 e 4% m/v) e BSA, Bovine Serum Albumin (entre 3 e 5% m/v). A diluição de soro variou entre 1:50 e 1:250 v/v. A concentração do reagente ureia variou com relação ao tempo de incubação (10 e 15 min) e concentração do reagente (6 e 8 molares). Marcadores moleculares específicos foram utilizados como anticorpos secundários, estes foram os anticorpos anti-human IgG conjugados com biotina. Os anticorpos secundários foram diluídos entre 1:5.000 e 1:25.000 v/v. Por fim, proteínas ligantes de biotina conjugada por peroxidase foram também variadas entre as concentrações 1:7.500 e 1:15.000.

[028]. As etapas do método ELISA variando as condições foram as seguintes, em ordem de realização:

- a) Incubação da placa com 50-200  $\mu$ L de solução de antígeno diluída nas diferentes concentrações em poços de microplacas de alta aderência, mantida a 4 °C overnight;
- b) Incubação com 50-200  $\mu$ L de solução de bloqueio nas diferentes concentrações e reagentes, a 37 °C por 1 h;
- c) Incubação com 50-200  $\mu$ L de solução de soro diluída nas diferentes concentrações, a 37 °C durante 1 h. Para esta etapa avaliou-se a mesma condição utilizando como amostra mistura (pool) de soros positivos e uma amostra de soro negativa;
- d) Incubação da solução contendo 6 ou 8 molares do reagente de Ureia por 10 ou 15 minutos a 37 °C.

- e) Incubação com 50-200  $\mu$ L de solução de anticorpos secundários diluídos nas diferentes concentrações e para diferentes marcadores, a 37 °C durante 1 h;
- f) Incubação com 50-200  $\mu$ L de solução de neutravidina (conjugado neutravidina-peroxidase) diluída nas concentrações entre 1:7.500 e 1:15.000 v/v, a 37 °C durante 1 h;
- g) Incubação com 50-200  $\mu$ L da solução cromogênica TMB (tetrametilbenzidina) a temperatura ambiente durante 30 min, ao abrigo da luz;
- h) Adição de 10-100  $\mu$ L da solução de parada (HCl 5N);
- i) Leitura de absorbância no comprimento de 450 nm.

[029]. Entre as etapas 'a' até 'g' realizaram-se em cada poço 2 a 6 lavagens com cerca de 200  $\mu$ L de solução salina contendo Tween 20 e secas por inversão em papel absorvente antes da próxima incubação.

[030]. Os valores de absorbância (ABS) obtidos nas diferentes condições para os soros negativo e positivo e com ou sem ureia foram utilizadas para determinar as melhores condições para identificação do índice de avides de IgG nas amostras. Para isso, o valor de porcentagem entre os valores de absorbância do ensaio com a etapa de incubação com ureia e valores da etapa sem incubação determinou o Índice de Avides (IA) dos anticorpos em cada amostra. Frente a um painel de 6 soros positivos para IgM e IgG (IgM+ e IgG+) e 20 soros positivos para IgG (IgM- e IgG+), encontrou-se uma faixa de índice de avides entre 21 a 98,9%. Alta avides são considerados soros com percentual maior que 60%. Média e baixa avides seriam entre 50-60% e menor que 50%, respectivamente. Dos 6 soros positivos para IgM, 5 apresentaram índice avides baixo ou médio, demonstrando que tais indivíduos estão potencialmente com a infecção ativa e 1 alta avides,

demonstrando que este indivíduo está potencialmente imunizado. Por outro lado, todos os 20 soros positivos para IgG apresentaram alto índice de avidéz, demonstrando que tais indivíduos não foram expostos ao patógeno recentemente e possivelmente não estão com infecção ativa.

[031]. A Tabela 3 apresenta os melhores valores de absorbância e índice avidéz obtidos dentro das faixas de condições avaliadas entre valores para soros positivos e soros negativos.

[032]. Tabela 3: Valores de ABS obtidos a partir de amostras de pacientes IgM+ e IgG+ e IgM- e IgG+ para avaliar o Índice Avidéz (IA) de anticorpos IgG utilizando o peptídeo P.SC2.S.132 pelo método ELISA.

IgM+ e IgG+			IgM- e IgG+		
C/ Ureia	S/ Ureia	IA	C/ Ureia	S/ Ureia	IA
0,25	0,689	36,28447	0,758	0,854	88,75878
0,275	0,885	31,07345	0,559	0,625	89,4400
0,356	0,615	57,88618	0,912	0,922	98,9154
0,458	0,523	87,5717	0,948	1,035	91,5942
0,169	0,462	36,58009	1,053	1,125	93,6
0,147	0,698	21,06017	0,685	0,852	80,39906
			0,658	0,75	87,73333
			0,904	0,944	95,76271
			0,601	0,629	95,54849
			0,823	0,952	86,44958
			0,584	0,647	90,26275
			0,744	0,857	86,81447
			0,958	1,054	90,89184
			0,812	0,985	82,43655
			0,74	0,748	98,93048
			1,005	1,128	89,09574
			0,633	0,785	80,63694
			0,501	0,631	79,39778
			0,9	0,941	95,64293
			0,925	1,125	82,22222

Exemplo 3: Confeção do kit de teste diagnóstico sorológico de COVID-19 aplicando o antígeno peptídico sintético P.SC2.S.132 para determinação do índice de avidéz.

[033]. A confecção do kit de diagnóstico para COVID-19 aqui proposto compõe as etapas de preparo e envase de reagentes, produção do antígeno, sensibilização da microplaca, embalagem e armazenamento.

[034]. Os reagentes incluídos no kit são:

- a) Solução de lavagem: solução aquosa concentrada (entre 5 e 15x), composta de NaCl em concentração entre 7,2 e 10,8% (m/v) e Tween 20 em concentração entre 0,4 e 0,6% (m/v), acondicionada em frasco plástico opaco de 50 mL. Reagentes NaCl e Tween 20 obtidos comercialmente e diluídos em água destilada;
- b) Solução de incubação diluente: solução aquosa concentrada entre (5 e 15 x), composta de caseína em concentração entre 1,6 e 4,4% (m/v) em solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4, acondicionada em frasco plástico opaco de 50 mL. Reagente caseína obtido comercialmente e diluído em água destilada;
- c) Solução de Ureia 6 molar, acondicionada em frasco plástico escuro de 50 mL. Solução obtida comercialmente;
- d) Solução de anticorpo secundário Anti-IgG conjugadas a biotina, acondicionada em frasco plástico opaco de 2 mL. Imunoglobulinas obtidas comercialmente e diluídas com água ultra-pura;
- e) Solução de conjugado: solução aquosa concentrada de neutravidina conjugada a peroxidase, acondicionada em frasco plástico opaco de 2 mL. Conjugado obtido comercialmente e diluído com água ultra-pura;

- f) Solução substrato de revelação: solução de substrato cromogênico TMB (5,5'-tetrametilbenzidina), acondicionada em frasco plástico escuro de 50 mL. Solução obtida comercialmente;
- g) Solução de parada da reação: solução aquosa composta de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 M, acondicionada em frasco plástico escuro de 50 mL. Reagente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> obtido comercialmente e diluído com água destilada.

[035]. O antígeno pode ser obtido por expressão biológica ou síntese química, como descrito no Exemplo 1. Para produção dos kits utiliza-se peptídeos sintetizados em equipamento automatizado. Os aminoácidos utilizados são modificados com grupos de proteção na cadeia lateral e grupo Fmoc no terminal N. Todos reagentes utilizados são de grau para cromatografia com pureza maior que 99%. São realizados 17 ciclos de ligação, um para cada aminoácido do peptídeo sendo adicionado. Após isso, os peptídeos são clivados da resina suporte e seus grupos funcionais de proteção removidos utilizando solução de TFA (ácido trifluoroacético, 92,5%), β-mercaptoetanol (2,5%), Tri-isopropil Silano (2,5%) e água ultra-pura (2,5%) sob agitação durante 4 h.

[036]. Os peptídeos clivados são filtrados para retirada da resina clivada. A solução de peptídeos é diluída (1:20 v/v) em solvente éter tert-butil-metil e incubado a -20 °C *overnight*. Em seguida são realizadas duas etapas de lavagem com o mesmo solvente, onde a solução é centrifugada (30 min, 4.000 rpm) e ressuspendida. Peptídeos precipitados na última etapa de lavagem são ressuspensos em água ultra-pura e congelados a -80 °C *overnight*. Segue-se para etapa de liofilização a temperaturas menores que -40 °C e pressão negativa de cerca de 83 mbar durante 24 h. São mantidos a -20 °C liofilizados em

frascos lacrados ou ressuspensos em solução tampão fosfato-salina pH 7,0. Peptídeos ressuspensos são esterilizados por filtração em membrana de poro 0,22 µm em cabine de segurança biológica com fluxo laminar (Classe II B2). A solução é quantificada quanto ao seu conteúdo proteico total utilizando o método BCA (ácido bicinchonínico). A concentração de peptídeos é ajustada dentro da faixa de 0,1-1,5 µg/mL com solução de revestimento (solução tampão carbonato pH 9,0).

[037]. Em cabine de segurança biológica com fluxo laminar (Classe II B2) são adicionados 100 µL de solução de peptídeos (0,1-1,5 µg/mL) em cada poço de microplacas de 96 poços de fundo reto claro de alta aderência. Após incubação a 4 °C *overnight* (cerca de 18 h) são realizadas duas a seis lavagens com 50 a 250 µL de solução de lavagem 1x. São adicionados aos poços 120 µL de solução de bloqueio (BSA 3-5% m/v) e as microplacas incubadas em estufa a 37 °C durante 1 h. Duas a seis lavagens são realizadas com 50 a 250 µL de solução de lavagem 1x. As microplacas são seladas com filme e embalada a vácuo em sacos laminados metalizados.

[038]. A embalagem secundária compreende uma caixa contendo os reagentes do kit e a microplaca sensibilizada. Podendo ser esta de material plástico, papel ou combinação destes. Cada frasco de reagente e a microplaca sensibilizada são acondicionados de forma a ficarem fixos no interior da embalagem. Uma embalagem terciária é aplicada, esta sendo uma camada fina de plástico transparente envolvendo a caixa (embalagem secundária). O kit montado é mantido a 2-8 °C.

#### Descrição das Figuras:

[039]. Figura 1 - Componentes do kit ELISA de Avidéz contendo o antígeno P.SC2.S.132 para diagnóstico de COVID-19. Itens: (a) placa de 96 poços pré-tratada com o antígeno e solução de bloqueio fixados em cada poço; frascos de (b) solução tampão de incubação e (c) solução tampão de lavagem; frascos microtubos de solução de (d) Ureia 6M (e) anticorpo secundário anti-human-IgG (f) neutravidina-peroxidase; e frascos de solução (g) de revelação e (h) de parada.

[040]. Figura 2 - Fluxograma demonstrativo de etapas de uso do kit e método ELISA de Avidéz para diagnóstico de COVID-19 proposto nesta invenção.

[041]. Figura 3 – Reatividade dos soros IgM+ e IgG+ e IgM- e IgG+ para o antígeno P.SC2.S.132 com (U+) e sem (U-) ureia.

[042]. Figura 4 – Porcentagem do Índice Avidéz (IA) em pacientes IgM+ e IgG+ e IgM- e IgG+ para determinação de pacientes com infecção ativa (baixa ou média avidéz – 0 a 70% ou alta avidéz – acima de 70%).

## REIVINDICAÇÕES

1. PEPTÍDEO P.SC2.S.132 caracterizado por compreender a sequência Seq ID Nº 1(P.SC2.S.132).
2. PEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser utilizado como antígeno para detecção em imunoenaios por meio da presença de anticorpos circulantes ou outras moléculas ligantes contra a doença COVID-19.
3. PEPTÍDEO, produzido por via sintética 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 saliva, urina, sangue, preferencialmente sangue.
4. PEPTÍDEO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser utilizado como ligante à imunoglobulinas presentes no soro ou moléculas envolvidas direta ou indiretamente no processo de autoimunidade.
5. USO DO PEPTÍDEO, conforme definidos nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser 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 fisiologicamente aceitável.
7. MÉTODO ELISA DE AVIDEZ 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, a um ou mais polipeptídeos consistindo das sequências de aminoácidos Seq ID Nº 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) mediante o uso do peptídeo P.SC2.S.132, 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 1:7500 até 1:20000 no tampão de incubação.

## DESENHOS

Figura 1

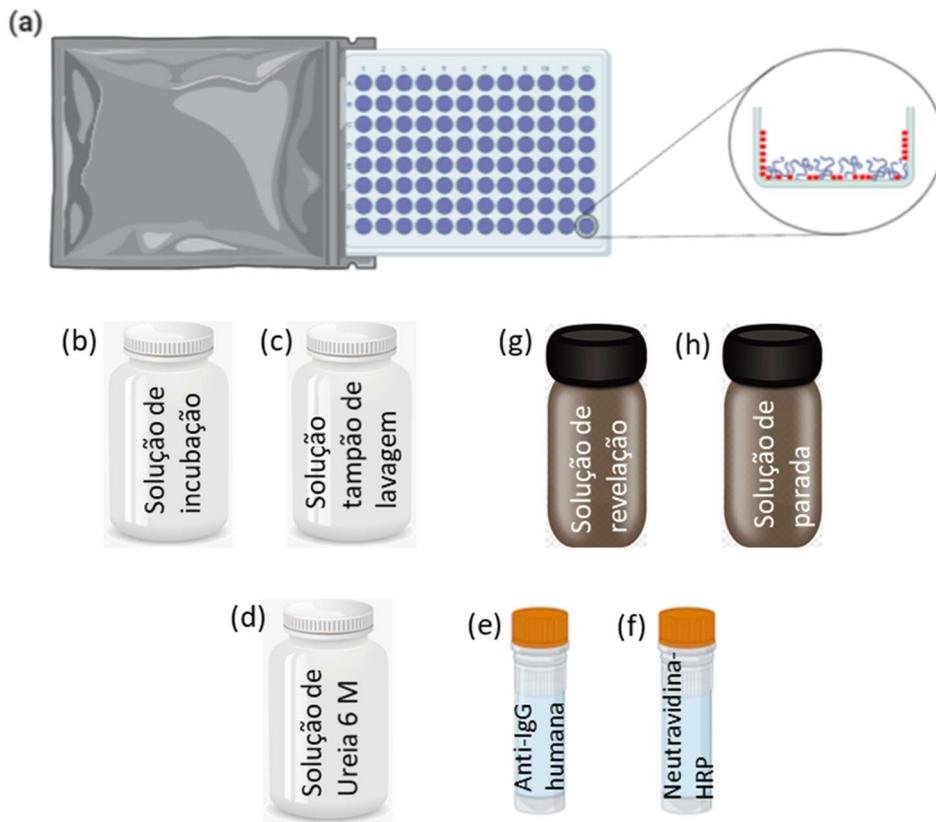


Figura 2

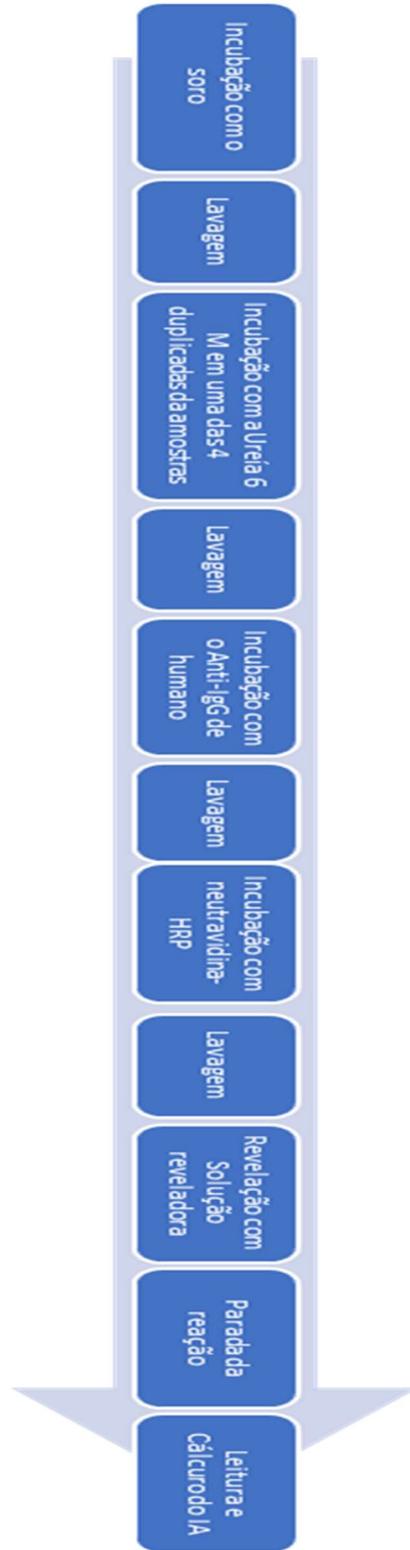


Figura 3

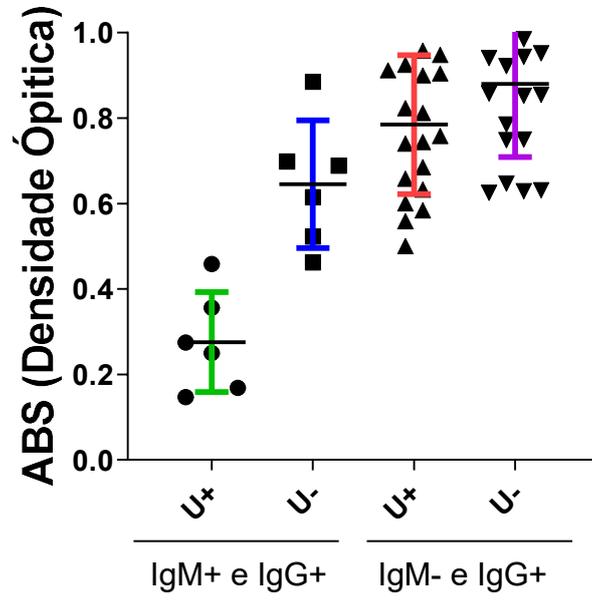


Figura 4

