Assinado Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

MINISTÉRIO DA ECONOMIA

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020019899-8

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.

Patente de trâmite prioritário

(21) Número do Depósito: BR 102020019899-8

(22) Data do Depósito: 29/09/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 23/11/2021

(51) Classificação Internacional: C07K 7/08; A61K 39/04; G01N 33/569; A61P 31/06.

(54) Título: ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.MT.PD.7 PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE E SEU USO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E MÉTODO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2° ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira

(72) Inventor: VANETE THOMAZ SOCCOL; NATALIA NOTTO SERENA; RAPHAEL APARECIDO BOSCHERO; CARLOS RICARDO SOCCOL; VIOLETTA PACCE.

Código de Controle: C21807240B6C62F9 B3C8118C66AD5B5F

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 29/09/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 28/06/2022

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

"ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.Mt.PD.7 PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE E SEU USO, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E MÉTODO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE"

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção trata de um novo antígeno para uso em diagnóstico imunológico para tuberculose, usando peptídeo mimético de *Mycobacterium tuberculosis*selecionado pela técnica de phage display e sintetizado quimicamente ou por estar apresentada em clones de bacteriófagos. A presente invenção reivindica: a sequência de aminoácidos do antígeno P.Mt.PD.7 (SEQ ID No. 1); seu uso em método imunológico usando o antígeno P.Mt.PD.7 (SEQ ID No. 1)ouclones de bacteriófagos; e kit diagnóstico a ser utilizado com os mesmos antígenos. Este antígeno,P.Mt.PD.7 (SEQ ID No. 1), apresenta maior sensibilidade e especificidade para diagnosticar tuberculose e permite o aperfeiçoamento da reatividade dos testes diagnósticos imunológicos.

Fundamentos da Invenção e Descrição do Estado da Técnica

[002]. A tuberculose (TB) é causada por várias espécies do gênero *Mycobacterium*, especialmente as do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Essas são as mais frequentes causadoras de infecção em humanos. A TB é considerada uma emergência de saúde pública desde a década de 1990, e continua a ser a principal causa de morte por doença infecciosa entre adultos em todo o mundo (FURIN, J.; COX, H.; PAI, *M. tuberculosis.* Lancet, v.393, p.1642-1656, 2019; LIMA, T.M.D.; BELOTTI, N.C.U; NARDI, S.M.T; PEDRO, H.D.S.P. Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF paradiagnóstico da tuberculose. Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 8, n. 2, p. 65-76, 2017). Tendo em vista que, em 2018, foram identificadas 1,5 milhão de mortes causadas pela tuberculose no mundo (World Health Organization, Disponível em: https://www.who.int/tb/global-report-2019, acesso em: 07/06/2020), a identificação rápida de casos clínicos ativos faz parte das ações preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para controlar o problema da epidemia de TB especialmente nos países do bloco BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) (World Health OrganizationDisponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/311259/9789241550512eng.pdf?ua=1&ua=1. Acesso em: 06/05/2019). Para diagnosticar os pacientes com suspeita de tuberculose, primeiro inicia-se pela avaliação clínica e a confirmação do diagnóstico é feita a partir da realização da baciloscopia, cultura, teste cutâneo (denominado de prova tuberculínica) ou teste rápido molecular para diagnóstico de

tuberculose (Xpert MTB/RIF) (BRASIL. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2019). A baciloscopia utiliza o método da coloração de Ziehl-Neelsen, que apesar do baixo custo e facilidade de execução, só é positiva quando há grande número de bactérias no material observado. Exigindo em média pelo menos 5.000 bacilos por mililitro. O que pode gerar resultado falso-negativo (COELHO, A.C.; et al. Coloração de Ziehl-Neelsen como método rápido de diagnóstico de para tuberculose ovina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia v.60, n.5., p.1097-1102, 2008). A cultura da bactéria requer menor número de bacilos, no material examinado, para ser positiva. A vantagem é que permite a identificação da espécie de micobactéria e testa a sensibilidade aos quimioterápicos. Mas a desvantagem é que é um método demorado, podendo levar em média 40 dias para obter o resultado facilitando a disseminação do agente patogênico. O teste cutâneo, também chamado de prova da tuberculina, ou teste da hipersensibilidade tardia, é a técnica onde se realiza injeção intradérmica de um derivado proteico purificado (PPD) de componentes solúveis de *M. tuberculosis* no paciente para avaliar se houve exposição prévia do organismo ao patógeno (ARIAS-GUILLÉN M. Advances in the diagnosis of tuberculosis infection. Archives of Bronconeumology v.47, p.521-530, 2011). Apesar de possuir baixo custo pode levar a resultado falso positivo ocasionado pela reação com o antígeno da vacina BCG. O teste Xpert MTB/RIF, fornece um resultado rápido, com especificidade de 99% e sensibilidade de 89%. Apresenta a desvantagem de ser oneroso e necessitar de estrutura elétrica estável e acondicionamento em ambiente refrigerado, dificultando a utilização principalmente em áreas remotas além de necessitar de um equipamento específico (PINTO, M. F.T., et al. Impacto orçamentário da incorporação do GeneXpert MTB/RIF para o diagnóstico da tuberculose pulmonar na perspectiva do Sistema Único de Saúde, Brasil,2013-2017. Cadernos de Saúde Pública, v.33, n.9. e00214515, 2017).Como alternativa, os testes sorológicos são métodos atrativos devido à fácil realização, automação e possibilidade de aplicação na fase inicial da doença. Ainda, possuem a vantagem de não serem invasivos e são de baixo custo. O ELISAindireto (ensaio de imunoabsorção enzimática) é um teste sorológico capaz de detectar anticorpos específicos em uma amostra biológica, como no soro de um paciente. É amplamente utilizado devido à facilidade de execução, acessibilidade, segurança e resultados precisos (LAKSHMIPRIYA, T. et al. Signal enhancement in ELISA: Biotin-streptavidin technology against gold nanoparticles. JournalofTaibahUniversity Medical Sciences, v.11, n.5, p.432-438, 2016), sendo um teste rápido e robusto o suficiente para ser implementado em condições adversas, como em países em desenvolvimento (TEIXEIRA, H.C.; ABRAMO, C.; MUNK, M E. Diagnóstico

imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v.33, n.3, p.323-334, 2007).

[003]. Para contextualizar o estado da arte desta invenção e observar as inovações nesse assunto, foi realizada uma busca de documentos patentários referentes a testes sorológicos para diagnóstico de tuberculose em humanos nas bases de dados PatentInspiration e do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Na plataforma Patent Inspiration, a buscafoirealizadautilizandoostermos: (tuberculos* OR "neglected diseases" OR "Koch* Disease" OR Infection* OR "Mycobacterium tuberculosis" OR "Koch* bacillus") AND (ELISA OR diagnos* OR immunoezymatic OR antigens OR Tuberculin OR bacilloscopy OR PPD OR "Purified Protein Derivative" OR analysis OR Intradermoreaction OR "Delayed Hypersensitivit*" OR "Phage display" OR peptides OR recombinant OR immunoinformatic OR Immunodetection OR prediction OR immunogenicity). Além de restringir a busca (AND) utilizando as classificações CIP (Classificação Internacional de Patentes): (A61B OR A61K38/10 OR G01N33/53 OR G01N33/569) AND (A61K39/04). O resultado foi de 452 documentos patentários depositados em diferentes partes do Mundo. Retirando-se os duplicados, chegou-se a 169, e após leitura, foram classificadas 107 como pertinentes ao tema. Na base de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), a busca foi realizada utilizando os termos: (tuberculos* OR doença* negligenciada* OR Infecç* OR *Mycobacterium tuberculosis* OR bacilo Koch) AND (ELISA OR diagnóstico* OR imunoenzimático OR antigen* OR tuberculina OR baciloscopia OR PPD OR Derivado de proteína purificada OR análise* OR intradermorreação OR Hipersensibilidade tardia OR Phage display OR Fagos OR peptídeo* OR recombinante* OR imunoinformatica OR Imunodetecção OR predição OR imunogen*). Além de restringir a busca (AND) utilizando as classificações CIP: (A61B OR A61K38/10 OR A61K39/04 OR G01N33/53 OR G01N33/569). O resultado obtido foi de 17 documentos patentários. Após leitura, classificaram-se seis como sendo pertinentes ao tema.Ao realizar a análise dos documentos patentários pertinentes ao tema foram encontradas diferenças em relação a presente invenção. Além disso, na presente invenção o antígeno constitui-se de um peptídeo com sequência de aminoácidos diferentes dos demais documentos patentários, apresentando simultaneamente identidade e similaridade menores que 100% quando comparada em banco de sequências patenteadas (BLASTp) (Stephen F. Altschul, T et al., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generationofproteindatabasesearchprograms, NucleicAcidsResearch, v.25, p.3389-3402, 1997). Na invenção do documento patentário BR1120180754625 (KeiInternationalLimited/Tomorrows IP Limited. Método para detectar a presença de material micobacteriano em uma

amostra com o uso de um antígeno de manosilfosfocetídeo imobilizado, substrato sólido e biossensor. Depositante: KeiInternationalLimited(CN)/Tomorrows IP Limited (CN). BR 11 2018 075462 5 A2. 08/06/2017) além da sequência do peptídeo ser diferente, utiliza-se solução de bloqueio como controle negativo. O que não possui as mesmas características que soros de indivíduos negativos e podendo induzir a um resultado falso-positivo. Também não permite calcular o nível de corte da reação entre exames positivos e negativos. As invenções ZA200107602B, BR9908083A, US2017234871A1e GR3024408T3 além de não usarem o mesmo antígeno necessitam de soluções mais concentradas de antígeno, soro e conjugado que a presente invenção, impactando no custo do teste. Ressalta-se ainda que na presente invenção o antígeno é diferente, pois trata-se de um peptídeo mimético selecionado pela técnica de phage display (HENDRICKSON, R.C.; LODES, M.J.; HOUGHTON, R. L. Compoundsandmethods for thediagnosisandtreatmentoftuberculosis are disclosed. Depositante: CorixaCorp. ZA200107602B. 28/01/2004,13/09/2001; REED, S.G.; et al. Polipeptídeo, molécula de DNA, Vetor de expressão recombinante, célula hospedeira, processo para detectar infecção de *M.tuberculosis*em uma amostra biológica, Kit diagnóstico, anticorpo monoclonal e proteína de fusão. Depositante: CorixaCorp. BR9908083A. 17/07/2007; AMICOSANTE, MASSIMO; et al. *Mycobacterium tuberculosis*proteins. Depositante: Oxford Immunotec LTD [GB].US2017234871A1. 17/08/2017.21/05/2019; CONTENT, J; DE WIT, L; DE BRUYN, J. *Mycobacterium* polypeptides and nucleic acids encoding them for diagnosis and control of tuberculosis. Depositante: Innogenetics NV. GR3024408T3. 10/08/1997. 28/11/1997). A invenção EP1787994A1, além de necessitar de antígeno nas concentrações entre 1 a 10 g/mL, apenas foi testado em apenas 10 pacientes positivos e 10 indivíduos negativos. Enquanto na patente WO9726007A1 foi testada apenas 11 soros (ANDERSEN, P; et al. TB vaccine and diagnostic based on antigens from M. tuberculosis cell. Depositante: StatensSeruminstitut. EP1787994A1. 23/05/2007; FENTON, M.J.; JOHN, B.; JAWAHAR, R.I. Mycobacterium antigens and methods for their detection. Depositante: Univ Boston [US].WO9726007A1. 24/07/1997). A invenção US5916558A além de necessitar de antígeno e conjugado mais concentrados (aumentando o custo do teste), necessita incubação por 2 h a 27 °C em uma câmara úmida, antes de ser incubado *overnight* (aumenta o tempo do teste e consequentemente a liberação do resultado). A invenção ZA9106431B foi testada em 27 soros de pacientes, e reagiu com no máximo 54,8% dessa amostragem (apresentando baixa sensibilidade) (CONTENT, J, et al. Recombinant polypeptides and peptides, nucleic acids coding for the same and use of these polypeptides and peptides in the diagnostic of tuberculosis. Depositante: Innogenetics NV [BE].US5916558A. 21/05/1995. 29/06/1999; PATARROY, M.E. Nucleotide and amino acid

sequences of protein MTP 40 of *M. tuberculosis* and synthetic peptides derived therefrom. Depositante: Manuel ePatarroy. ZA9106431B. 13/08/1991. 27/05/1992). Na invenção CN101838660A, a proteína utilizada para o teste foi obtida por via recombinante, impactando no custo do teste e utiliza proteína total e não peptídeo mimético como na presente invenção. As invenções US4889800A e JPH02169599A apresentam alto risco de resultado falso positivo e ou falso negativo por se tratar do uso de antígeno que é uma proteína proveniente também de *Mycobacterium bovis*. A sequência está presente no conteúdo proteico da vacina BCG, produzida com *M. bovis*, e pode ser positiva em indivíduos vacinados, ou ainda pode ter similaridade com outras espécies de *Mycobacterium* (BAO, H. et al. *Mycobacterium tuberculosis* recombinant fusion protein and application thereof. Depositante: Univ Jilin. CN101838660A. 22/09/2010; SHINNICK, T.M.; MINDEN, P.; HOUGHTEN, R.A. Synthetic polypeptides and receptor molecules derived therefrom and methods of use. Depositante: Scripps Clinic Res [US]. US4889800A. 20/08/1987. 26/12/1989;YAMAGUCHI, T.; et al. Peptide including antigenic determinant region of mpb57 protein originating from BCG cell. Depositante: Ajinomoto Kk, Yamada Takeshi. JPH02169599A. 29/06/1990). A invenção JPH09234096A foi testada apenas com soro policlonal de coelho e, portanto, não se sabe como se comportará com soro de humanos. A invenção US2019025301A1 necessita tratamento da amostra com agente estimulante por no mínimo doze horas, aumentando o número de passos na reação e o risco de erros (JAN, K, et al. Recombined polypeptide and peptide, nucleic acid coding the same and its use for tuberculosis. Depositante: Innojieneteikusu SA NV. JPH09234096A. 09/09/1997. 17/03/1999; GE, S., et al. Method and Kit for diagnosis of active Tuberculosis. Depositante: Univ Xiamen, Beijing Wantai Biological Pharmacy Ltd.US2019025301A1. 24/01/2019).

Descrição da abordagem do problema técnico

[004]. Atualmente os serviços de saúde usam as técnicas de baciloscopia, cultura, teste cutâneo (denominado de prova tuberculínica) e teste rápido molecular para diagnóstico de tuberculose. Todas apresentam desvantagens, algumas porserem demoradas para emitir o laudo diagnóstico permitindo ao portador disseminar o patógeno para outras pessoas; outras por darem reação cruzada com a vacina de BCG e a última por necessitar de equipamentos específicos podendo ser encontradas geralmente em grandes centros. A presente invenção usa como novo antígeno peptídeo mimético sintetizado quimicamente em teste ELISA e possui sensibilidade e especificidade de 100 e 98,5%, respectivamente. A invenção proposta permite diferenciar pacientes com tuberculose de indivíduos sadios. A presente invenção apresenta vantagens em

relação aos outros métodos usados atualmente, como baixo custo, facilidade na automação, alta sensibilidade e especificidade. Além disso, a presente invenção por ser um método indireto não é invasivo, é rápido, de fácil execução e automação, permitindo aplicação em grande número de amostras ou simplesmente no diagnóstico individual.

[005]. Esta invenção apresenta um antígeno novo selecionado pela técnica de phage display para uso em kit diagnóstico da tuberculose. A sequência do peptídeo (Seq.ID.No 1) foi avaliada na ferramenta BLAST-p (ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignmentsearch tool. Journal Molecular Biology, v.215, n.3, p.403-410, 1990; ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAEFER, A.A., NucleicAcidsResearch, v.25, p. 3389-3402, 1998) e apresentou cobertura e identidade acima de 90%, com *Mycobacterium tuberculosis* e baixa similaridade para *H. sapiens*.

Descrição detalhada da Invenção

[006]. A presente invenção refere-se ao uso de um peptídeo mimético obtido pela técnica de *Phage Display* para o diagnóstico de tuberculose humana ou animal. A tecnologia de exibição de fagos foi estabelecida há mais de 20 anos e é amplamente utilizada na descoberta de anticorpos em estágio inicial. No entanto, até o momento apenas um número limitado de produtos aprovados foi criado por meio de exibição de fagos (MOURA J.; ALVARENGA, L. M. ; THOMAZ-SOCCOL, V.T. Biotechnological role of phage displayed peptides for the diagnosis of neglected tropical diseases. In: Vanete Thomaz Soccol; Rodrigo Rezende; Ashok Pandey. (Org.). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications. 1ed.: 2016, v. 1, p. 1-15).

[007]. A técnica do *Phage Display* permite a expressão de bibliotecas e a seleção de ligantes específicos (MOURA J.; ALVARENGA, L. M. ; THOMAZ-SOCCOL, VT . Biotechnological role of phage displayed peptides for the diagnosis of neglected tropical diseases. In: Vanete Thomaz Soccol; Rodrigo Rezende; Ashok Pandey. (Org.). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications. 1ed., 2016, v. 1, p. 1-15), e é uma alternativa para identificar novos antígenos micobacterianos, para uso em diagnóstico, imunoterapia e vacinas, importante para a tentativa de solucionar a falta de especificidade e sensibilidade dos métodos existentes (*AZZAZY* H.M.; *HIGHSMITH* W.E.Jr, Phage display technology: Clinical applications and recent innovations. Clinical Biochemistry v.35 p.425-445, 2002).

[008]. Na presente invenção, bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos foram rastreadas usando anticorpos e mais especificamente, anticorpos antígeno-específicos.Os anticorpos usados na presente invenção para a seleção de peptídeos de bibliotecas de fagos foram provenientes de um *pool* de amostras de soro de diferentes indivíduos naturalmente infectados com *M. tuberculosis*. O uso do *pool* de soros visou abranger maior diversidade de anticorpos das diferentes formas clínicas. Anticorpos antígeno-específicos foram submetidos à precipitação com sulfato de amônio com subsequente purificação por cromatografia de afinidade, em proteína-G, e purificados frente a antígenos de *M. tuberculosis* após *immunoblotting*. Porém, a obtenção de anticorpos antígeno-específicos não está limitada a esse exemplo, mas pode envolver o uso de um ou a combinação de dois ou mais procedimentos conhecidos do estado da técnica. Os anticorpos obtidos não são limitados à classe IgG, mas podem compreender as demais classes e suas subclasses de imunoglobulinas. O emprego de tais anticorpos antígeno-específicos para seleção de peptídeo em bibliotecas de fagos possibilita maior oportunidade de encontrar peptídeos miméticos (mimotopos) de antígenos micobacterianos.Para a realização da técnica, bibliotecas de fagos foram rastreadas utilizando anticorpos antígeno-específicos de *M. tuberculosis,* o que possibilitou maior oportunidade de encontrar peptídeos miméticos (mimotopos) de antígenos micobacterianos. Os clones dos fagos/peptídeos foram selecionados por reconhecer anticorpos de pacientes com tuberculose (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. ALBAN, S.; MOURA, J.; THOMAZ-SOCCOL V. Uso de peptídeos miméticos de *Mycobacterium leprae* para diagnóstico e vacina. BR00221103624550, 03 maio 2011, 03 maio 2014; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. THOMAZ-SOCCOL, V.; ALBAN, S.; SEGER, J.; SCOPELL, E. Peptideos miméticos de *Leishmania spp* processo para sua obtenção e suas aplicações. BR1020150177240, 24 julho 2015, 21 nov. 2017).Após o reconhecimento dos clones reagentes os mesmos foram submetidos à extração de DNA, sequenciados e os oligonucleotídeos obtidos foram transformados a aminoácidos e assim o peptídeo do presente documento patentário que é apresento na SEQ ID No. 1.

[009]. O peptídeo assim selecionado, por não ser epítopo natural, é denominado mimotopo, pois mimetiza parte do epítopo natural, pela similaridade na sequência ou similaridade em propriedades físico-químicas e ou organização espacial(DEMOLOMBE, V., et al. New approaches to mimic non-continuous epitopes. BMC Bioinformatics , v.20, p.387, 2019). Dentre os objetivos da invenção, está a avaliação do peptídeo obtido, para verificar se possui a capacidade de reagir com anticorpos do soro de pacientes portadores de TB, para

utilização em testes diagnósticos. Essa capacidade foi demonstrada no presente documento patentário (ver exemplos de uso descritos).

[0010]. As amostras biológicas utilizadas para análise são preferencialmente soro de pacientes humanos. No entanto, pode se estender ao uso de outras amostras biológicas de humanos ou animais como sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR), escarro, urina, entre outras amostras que contenham anticorpos.

[0011]. O peptídeo pode ser utilizado individualmente ou na forma de polímero. O polímero de peptídeos trata-se de um peptídeo mais longo formado pela repetição da mesma sequência peptídica (SEQ ID No. 1), podendo ou não ser separada por espaçadores ou *linkers*.

[0012]. A sequência de peptídeo (SEQ. ID.No.1), que trata a presente invenção, pode sofrer modificações originando variantes, desde que essas formas variantes mantenham as características antigênicas e/ou imunogênicas da sequência original da qual derivaram. O termo antigênico se refere a capacidade do antígeno de reconhecer o anticorpo ou receptor de linfócito T, enquanto, o termo imunogênico refere-se a capacidade de induzir uma resposta imune humoral e/ou celular.

[0013]. Modificação do peptídeo pode ser feita pela conjugação a proteínas carreadores como soro albumina bovina (BSA), ovalbumina, KLH (*keyholelimpethemocyanin*), toxóidedifitérico, toxóide tetânico, entre outras. Vários métodos são disponíveis para a conjugação de peptídeos a proteína como, por exemplo, conjugação via EDC, conjugação via MBS e conjugação via glutaraldeído.

[0014]. Outra modificação que pode ser realizada em peptídeos é a formação de MAPs (*MultipleAntigenPeptides*), que se caracterizam por utilizar alfa e beta-amino grupos de lisina para formar um esqueleto ao qual múltiplas cadeias de peptídeos podem ser fixadas. Os MAPs são uma alternativa a conjugação de antígenos a proteínas carreadoras.

[0015]. O peptídeo aqui reivindicado foi selecionado por phage display e produzido pela técnica de síntese química, porém, não se restringe a esta. Ele pode ser produzido também se utilizando a tecnologia de DNA recombinante, conhecida do estado da arte.

[0016]. Para fornecer um método diagnóstico, o peptídeo foi imobilizado em um suporte sólido (para que possa se ligar e permanecer adsorvido) e então colocado em contato com a amostra biológica

contendo anticorpos, obtida de indivíduos com tuberculose ativa ou latente, possibilitando a detecção da ligação entre peptídeo e anticorpo.

[0017]. Os suportes sólidos incluem microplacas de 96 poços de poliestireno ou polivinil cloreto (PVC), mas, não se restringindo a estas, membranas de nitrocelulose, fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou *nylon*, esferas de poliestireno ou agarose, vidro, entre outros. Moléculas que não interajam especificamente com o antígeno imobilizado a esses suportes são removidas por lavagem com soluções tampão adequadas. Para a detecção da interação entre antígeno e anticorpo, um segundo anticorpo (anticorpo secundário) marcado é adicionado. O suporte sólido pode ser novamente lavado para a remoção de anticorpos não ligados. A reação entre antígeno e anticorpo é revelada por um método, que depende da marcação empregada, de modo a produzir um sinal detectável ou mensurável. A intensidade do sinal indica a quantidade de anticorpo na amostra.

[0018]. O anticorpo primário é aquele que reconhece o antígeno. O anticorpo secundário reconhece o anticorpo primário. O anticorpo secundário é marcado, proporcionando a detecção do antígeno indiretamente. Esse anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal produzido em animais hospedeiros (camundongos, coelhos, cabras, ovelhas, entre outros), e deve ser espécie-específico do anticorpo primário.

[0019]. 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. A marcação mais utilizada é com a enzima peroxidase HRP (*horseradishperoxidase*), podendo ser utilizada também a biotina (mas não se limitando a estas). Anticorpos secundários podem ser marcados também com agarose ou ouro coloidal.

[0020]. Quando se utiliza biotina, é possível a detecção com avidina ou estreptavidina ou neutravidina marcadas com enzimas ou fluoróforos, tornando-se possível a amplificação do sinal e aumento da sensibilidade do teste.

[0021]. Uma das técnicas que permitem a detecção e quantificação de anticorpos, peptídeos, e proteínas é chamada de Enzyme-linkedImmunosorbentAssays (ELISA) também chamada de EnzymeImmunoassay (EIA). Essa técnica é realizada em placas de poliestireno ou PVC de 96 ou 384 poços nas quais proteínas, peptídeos

ou anticorpos são passivamente ligados. Moléculas pequenas, como peptídeos podem ser imobilizados com maior eficiência a placas por biotinilação de peptídeos e emprego de placas revestidas com estreptavidina. O formato da técnica pode ser direto, indireto, sanduíche ou de competição. Mais comumente, a detecção da reação entre antígeno e anticorpo é feita usando marcações fluorescentes ou enzimáticas. O sinal emitido após a adição dos substratos enzimáticos pode ser colorimétrico, quimioluminescente ou fluorescente. Entre os substratos colorimétricos estão *p-NitrophenylPhosphate, Disodium Salt* (PNPP), *2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammoniumsal*t (ABST),*o-phenylenediaminedihydrochloride*(OPD) e *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (*TMB).

[0022]. A presente invenção se refere ao uso do peptídeo com SEQ ID No. 1 para teste ELISA, mas não se restringindo a esta técnica. Outras técnicas podem ser utilizadas para detecção de anticorpos micobacteriandos, como Western Blotting/immunoblotting, imunoprecipitação, aglutinação, imunofluorescência, radioimuensaio, Spot Synthesis, microarranjo, dipstick (análise imunocromatográfica),*Multiantigen Print Immunoassay(MAPIA)*. Vários métodos podem ser utilizados para detecção da resposta humoral frente a antígenos, como os acima mencionados, porém não são limitados a esses.

[0023]. A presente invenção é ilustrada pelos exemplos abaixo, que têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

Exemplos de seleção de antígeno e seu uso em imunodiagnóstico

Exemplo 1 -Biosseleção de Bibliotecas Apresentadas em Fagos

Obtenção de anticorpos anti-*Micobacteriumtuberculosis*

[0024]. Os anticorpos anti-*M. tuberculosis* foram obtidos de 30 pacientes tuberculosos em tratamentocom diagnóstico confirmados pelos serviços especializados. As coletas foram feitas no estado do Paraná: em Curitiba, no Centro Regional de especialidades-Barão e na Lapa, no Hospital Regional da Lapa São Sebastião. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Universidade Federal do Paraná (registro CEP/SD:428.108.07.10) e no Comitê em Pesquisa Com Seres Humanos da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (processo no. 002/2008).

Bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos

[0025]. Quatro bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos (X15, X8CX8, XCX4CX e XCX8CX) foram utilizadas para identificação de mimotopos de antígenos micobacterianos. As bibliotecasforamobtidas de J. Scott, Simon Fraser University, Burnaby BC, Canada (BONNYCASTLE, L.L., MEHROKE, J.S., RASHED, M., GONG, X., SCOTT, J.K., Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. Journalof Molecular Biology; v.258, n.5, p.747-762, 1996).

Biosseleção de fagos

[0026]. A biosseleção foi realizada conforme descrito porVillard et al.(VILLARD, S., et al., Peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor. Blood, New York, v. 102, n. 3, p. 949-952,2003). Um imunotubo (Nunc) foi sensibilizado com 5 µg/1,5mL de imunoglobulina anti-*M. tuberculosis* em 100 mM $NaHCO_3$, pH 8,6 e incubado *overnight* a 4°C. O imunotubo foi lavado com TBST-0,05% (TBS Tween 20-0,05%), preenchido com uma solução de bloqueio (TBST-0,05%, BSA a 3%) e incubado durante 2 horas a 37 °C. Após a lavagem, o imunotubo foi incubado com fagos de cada uma das bibliotecas, em título correspondente a 100 vezes a complexidade da biblioteca em TSBT-0,05%.. Após lavagens com TBST a 0,5% e seguido de lavagens com TBST-0,05%, os fagos ligados foram eluídos com 1,5 mL de 0,1 M de glicina pH 2,2 e 1 mg/mL de BSA. Após a neutralização com 2 M de tris HCL, pH 9 os fagos eluídos foram amplificados por infecção em cultura de *E. coli* K91.

[0027]. Novamente foi incubado overnight 37 °C, o sobrenadante foi obtido e precipitado com PEG/NaCl. Quatro ciclos de seleção foram realizados e nos demais ciclos 2,0 x 10^{11} fagos amplificados do ciclo anterior foram incubados com IgG anti-*M. tuberculosis*. Os procedimentos foram iguais àqueles aplicados ao primeiro ciclo exceto para a massa do anticorpo imobilizado no imunotubo que foi 1,5 e 0,5 µg no segundo e subsequentes ciclos respectivamente.

Seleção de clones de fagos

[0028]. Após o quarto ciclo de seleção, clones de fagos foram isolados e avaliados quanto a capacidade de ligação a imunoglobulinas IgGanti-*M. tuberculosis*. Para tanto, placas de ELISA foram revestidas com 50 µL de anticorpo anti-bacteriófagofd (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) a 1:800 em tampão $NaHCO_3$ 100 mM, pH 8,6 e deixado *overnight* a 4 ^{0}C. As placas foram lavadas três vezes

com PBS% Tween-20-0,05 (PBST-0,05%) e em seguida bloqueadas com leite em pó desnatado a 2% em PBST-0,05% por uma hora em temperatura de 37 °C. O sobrenadante (50 mL) da cultura de cada um dos clones isolados foi adicionado a um diferente poço da placa e incubado por 2 h a 37°C.. Após a lavagem da placa foi incubada com 100 µg/mL de imunoglobulinas IgG total de pacientes tuberculosos em solução de bloqueiopor uma hora a 37 °C. Nova lavagem da placa foi realizada e adicionou-se anticorpo anti-IgG humana Fc-específica conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluído 1:10000 em solução de bloqueio e incubado por uma hora a 37 °C. Novas lavagens da placa e a reação foi revelada pela adição da solução substrato (0,2 mg/mL de OPD (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluído em tampão citrato pH 5,0 contendo 0,2 µL/mL de H_2O_2 a 30%. A placa foi incubada a temperatura ambiente e no escuro por 15 minutos e foi interrompida por adição de 10 µL de H_2SO_4 1:20. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm. Os clones mais reativos foram selecionados para o sequenciamento do DNA.

Sequenciamento do DNA e Sequência de aminoácido do peptídeo

[0029]. O DNA de cada clone de fago reagente foi extraído usando o *kit* QIAprep Spin M13 (Qiagen, Hilden, Alemanha). A metodologia foi realizada conforme descrição do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas com o *kit* BigDyeTerminator v3.1(AppliedBiosystems, Carlsbad, Califórnia, EUA) e em sequenciador automático ABI PRISM 377 (AppliedBiosystemsCarlsbad, Califórnia, EUA). O*primer* 5'-TCG GCA AGC TCT TTT AGG-3' foi usado para anelamento. As condições de sequenciamento foram 1 minuto a 96°C para desnaturação inicial do DNA seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por cinco segundos e extensão por quatro minutos a 60°C. Após homogeneização e incubação com isopropanolpor 20 minutos a temperatura ambiente os tubos foram centrifugados a 15.000 g por 25 minutos. O isopropanol foi removido por inversão e adicionou-se álcool 70%. Nova centrifugação a 15.000 g por 10 minutos e remoção do etanol por inversão. A secagem do DNA foi feita em estufa a 37°C e o armazenamento até seu uso foi a -20 °C. A análise da sequência obtida foi feita no software do equipamento. Após a identificação do DNA viral, as sequências foram avaliadas no programa *proteomics tools* disponível em http://expansy.ch. Opção de leitura tools-DNA-Proteins-Translate, 3'→5', utilizando-se a primeira janela de leitura-frame1), para obtenção da sequência dos aminoácidos codificada pelo seguimento de DNA inserido no fago. As sequências dos peptídeos obtidas foram analisadas quanto à similaridade com outras sequências já registradas no GenBank.

Síntese química do peptídeo

Exemplo 2- Síntese do peptídeo imobilizado em membrana e solúvel.

[0030]. A sequência de aminoácidos do peptídeoidentificado pela técnica do P*hage Display* acrescida da sequência SGS a porção N-terminal (SEQ ID No.1) foi utilizada para realizar a síntese química deste, baseando-se na técnica de síntese de peptídeos ancorados em matriz sólida (MERRIFIED M., SolidPhasePeptideSynthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide". Journal of American Chemistry Society, *v*. 85, n.14, p.2149–2154, 1963). Primeiramente, foi sintetizado imobilizado em membrana de celulose modificada pela técnica de SPOT-synthesis (FRANK, R., GULER, S., KRAUSE, S. AND LINDENMAIER, W. (1991) Facileandrapid ''spot-synthesis'' oflargenumbersofpeptidesonmembranesheets, in Peptides 1990: Proceedingsofthe 21st EuropeanPeptideSymposium (Giralt, E. andAndreu, D., eds.), ESCOM, Leiden, NL, pp. 151–152) e posteriormente, em resina de suporte em microcoluna, o que possibilitou a sua clivagem e obtenção do peptídeo na forma solúvel. Ambas as sínteses foram realizadas em sintetizador automatizado de peptídeos (RespPep SL, Intavis) utilizando aminoácidos modificados com grupo Fmoc e grupos de proteção de cadeias laterais.

[0031]. A membrana de celulose com o peptídeo imobilizado pode ser usada para a detecção de anticorpos específicos presentes em amostras biológicas, utilizando a técnica *Western Blotting*ou imunodetecção, mas não se restringindo a estas. O peptídeo obtido na forma solúvel pode ser utilizado como antígeno para detecção de anticorpos específicos presentes em amostras biológicas, utilizando a técnica ELISA (ver exemplo 4), mas não se restringindo a ela.

Exemplo 3- Avaliação da reatividade do peptídeo por imunodetecção em membrana.

[0032]. A técnica de imunodetecçãoou western blottem por base a ligação antígeno-anticorpo e a identificação, similar à da técnica ELISA, também conhecida do estado da arte. Explora a especificidade de anticorpos, utilizando antígenos imobilizados em uma membrana de celulose, onde foram sintetizados por spot síntese. Para determinar a especificidade desta ligação do peptídeo frente aos anticorpos primários específicos foram utilizados soros de pacientes expostos previamente ao *M. tuberculosis*. Os soros foram obtidos no Hospital Regional São Sebastião da Lapa, comprovadamente positivos para tuberculose por teste de baciloscopia realizada no Hospital. A avaliação da afinidade aos anticorpos contidos no soro foi identificada

após revelação da membrana, pela sua localização em filme fotográfico, marcado por exposição à quimioluminescência gerada pela reação de luminol sendo oxidado pela enzima peroxidase HRP conjugada à estreptavidina, a qual tem afinidade a biotina, conjugada ao anticorpo secundário (anti-IgG), que por sua vez reconhece anticorpos primários do soro ligados ao peptídeo.

[0033]. A membrana foi também revelada utilizando soros de pacientes não infectados (controle negativo), para observar a especificidade do peptídeo imobilizado. O peptídeo apresentou reação com o pool de soros positivos (Figura 1) e não reagiu com o pool de soros negativos, indicando ser um bom candidato à diagnóstico por resposta humoral.

[0034]. As membranas foram reveladas utilizando soros diluídos na proporção de faixa entre 1:100 a 1:400, anticorpo secundário na diluição de proporção entre 1:7500 a 1:12000 e conjugado estreptavidina-peroxidase na proporção 1:7500 a 1:12000.

[0035]. A membrana com os peptídeos imobilizados por spot síntese foi acomodada em recipiente onde permaneça submersa nas soluções em que serão expostas. A primeira incubação é realizada em metanol, temperatura ambiente por 2 min, seguida de lavagem. A lavagem é realizada com incubação em solução tampão TBS-T (NaCl, KCl, *Tris(hydroxymethyl)aminomethane* e Tween 20 – 0,05%, a pH 7,0.) a temperatura ambiente por 10 min e solução tampão de bloqueio (composta de caseína hidrofílica 3% m/v, sacarose 0,5% m/v, Tween 20 0,1% v/v e TBS) (4ºC) sob agitação (overnight). A membrana é então submetida à incubação com solução diluída do soro humano (37 ºC por 90 min), seguida de incubação com solução diluída de anticorpos anti-IgG (37 ºC por 60 min). Entre cada uma dessas etapas é realizada uma etapa de lavagem com TBS-T.

[0036]. Em sala escura (própria para revelação de filmes), acomoda-se a membrana em cassete de revelação, adiciona-se solução de revelação sobre a membrana e esta é coberta com plástico transparente e filme fotográfico acima deste. Mantém-se por 15 min o cassete de revelação fechado. Após isso, retira-se o filme fotográfico e este é submergido em soluções de revelação, lavagem, fixação e lavagem novamente. Havendo a presença da interação peptídeo-anticorpo primário (do soro), consequentemente o filme fotográfico naquela posição do peptídeo na membrana irá ser marcado após a reação de quimioluminescência gerada. A marcação no filme pode ser observada visualmente de forma qualitativa ou digitalizada e quantificando o volume de pixels presentes.

Exemplo 4- Determinação da reatividade do peptídeo no teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) frente a soro de pacientes com TB e indivíduos saudáveis

[0037]. Amostras de sangue foram obtidas de pacientes com tuberculose (36 pacientes), portadores de diferentes formas da doença e provenientes do Hospital Regional da Lapa São Sebastião (Lapa, Paraná). Foram também coletadas amostras de sangue de pessoas saudáveis (66 amostras) para controle negativo da reação. Todos os indivíduos autorizaram a coleta de sangue por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

[0038]. A técnica de ELISA foi realizada em placas de poliestireno de 96 poços, da marca Costar com fundo chato, mas não se limitando a estas. O peptídeo da invenção (SEQ ID No.1) foi imobilizado na placa, para ser utilizado como antígeno. Para confirmar a reatividade do peptídeo frente a soros de pacientes pela técnica ELISA nesta invenção, primeiramente foi realizada a padronização dos diferentes parâmetros usados no teste ELISA (concentração de antígeno, diluição dos soros e diluição dos conjugados).Ou seja,avaliou-se diluições ou concentrações que sejam capazes de melhor discriminar entre soros positivos e negativos. Além disso, verifica-se o melhor bloqueio para o antígeno testado.

[0039]. Os testes passaram a ter a seguinte padronização: antígenos de 6,25 a 1000 ng por poço, soro diluído nas proporções entre 1:50 e 1:500, usa-se o BSA (*bovineserumalbumin*) como solução de bloqueio, mas não se restringe a esta solução de bloqueio; e conjugado diluído nas proporções de 1:6.000 a 1:18000. O KIT ELISA aqui pleiteado não se restringe a essas condições.

[0040]. Para a realização dos testes, se realiza a sensibilização de cada poço com 100 µL do antígeno (nas condições acima especificadas) diluído em tampão de cobertura (*coatting buffer)* (Na_2CO_3 0,16%, $NaHCO_3$ 0,29%, pH 9,6) por poço e incubação overnight a 4 °C. Após esta etapa, para remoção do antígeno não fixado no poço, a solução deve ser descartada e os poços lavados duas vezes, com solução de lavagem (NaCl 0,9% - Tween 20 0,05%). O bloqueio dos espaços dos poços não ocupados pelo antígeno é realizado, adicionando-se 120 µL de solução de bloqueio (BSA 1 a 4% em PBS pH 7,4) por poço e incubado por uma hora a 37 °C. Após incubação, novas lavagens são realizadas. Os soros devem ser diluídos em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7,4 - Tween 20 0,05%), adicionados a cada poço e incubados em estufa a 37 °C por uma hora. É então realizada nova etapa de lavagem, quatro a seis vezes. Em seguida são adicionados 100 µL por poço do anticorpo secundário

(conjugado Anti-IgGhumano-biotina) diluído em tampão de incubação e as placas incubadas por uma hora a 37 °C. Novas lavagens são realizadas para adição do conjugado neutravidina-peroxidase, diluído em tampão de incubação, e submete-se à incubação por uma hora a 37 °C. Após lavagem, adiciona-se o substrato OPD (2 mg) diluído em 10 mL de tampão citrato 0,15 M, pH 5,0 e 2 µL de peróxido de hidrogênio, não se limitando a este substrato. Após 15 minutos ao abrigo de luz, é efetuada a parada da reação adicionando-se 25 µL de solução de ácido sulfúrico 5%. A leitura da absorbância é então realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 a 492 nm.

[0041]. Após obtenção das melhores condições para o teste, foi realizada a determinação do nível de corte (*cut-off*) do teste, entre positivos e negativos.

[0042]. A amostragem consistiu de 36 soros humanos de pacientes (provenientes do Hospital São Sebastião da Lapa), todos já diagnosticados clinicamente com tuberculose. O grupo de controle negativo consistiu de pessoas saudáveis não apresentando quadro clínico compatível com a doença. Estes dois grupos serviram para a validação do teste e determinação da sensibilidade e especificidade da reação. A sensibilidade, especificidade e nível de corte da reação entre soro positivos e soros negativos *cutoff* foram determinadas pelo software MedCalc (StatisticalanalyseswereperformedusingMedCalc for Windows, version 15.0 - MedCalc Software, Ostend, Belgium) (ver Tabela 1).

Tabela 1 -Populações estudadas, intervalo de confiança, sensibilidade e especificidade do teste

Variáveis	P.Mt.PD.7
Classificação das variáveis	Diagnóstico
Tamanho daamostra	102
Grupo positivo[a]	36(35,29%)
Grupo negativo[b]	66(64,71%)

[a]Positivo = 1[b]Negativo = 0

Áreasob a curva(AUC)

Área sob a curva ROC (AUC)	0,999
Erro padrão[a]	0,00122
95% Intervalo de confiança[b]	0,962 a 1,000
95% *Bootstrap* CI[c]	0,990 a 1,000
Estatística z	409,385
Nível de Significância P (Área=0.5)	<0,001

[a]DeLong et al., 1988 (DELONG ER, DELONG DM, CLARKE-PEARSON DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. v. 44, n. 3, p.837-845, 1988.);[b]Binominal exato; [c]BC_a*bootstrap*intervalo de confiança (1000 interações; números aleatórios: 978).

Critério ótimo

Critério ótimo[a]	>0,301
95% Intervalo de confiança[b]	>0,276 a>0,438
Sensibilidade	100,00
Especificidade	98,5

[a]Levando em conta a prevalência da doença (35,3%) e custos estimados:

Falso Positivo: 1; Falso negativo: 1

Verdadeiro positivo: 0; verdadeiro negativo: 0

[b]BC_aintervalo de confiança de *bootstrap* (1000 interações; números aleatórios: 978).

[0043]. A sensibilidade e especificidade do teste foram avaliadas com os resultados dos testes de ELISA realizados utilizando o peptídeo produzido, objeto da presente invenção, como antígeno, e os soros de uma população de 36 pacientes doentes e 66 indivíduos sadios, seguindo as condições de teste determinadas pela padronização.

[0044]. A sensibilidade e especificidade obtidas foram de 100 e 98,5% para o teste, demonstrando que o peptídeo Seq.ID.No:1 é um excelente candidato para uso no diagnóstico de tuberculose.

Descrição das Figuras

[0045]. **Figura 1**→A figura 1 representa a revelação da reação antígeno/anticorpopor imunodetecção. Ou seja, a reação revelao reconhecimento dos peptídeos miméticos imobilizados em membrana pelo anticorpo presente no soro de pacientes portadores de tuberculose, pela técnica de imunoblot. A reação para cada soro foi realizada em triplicata.

[0046]. **Figura 2**→A figura 2 representa a curva ROC (*receiveroperatorcharacteristic curve*) onde aponta a sensibilidade e especificidade do teste enzima-imuno-ensaio, bem como o ponto de corte da reação entre exames positivos e negativos.

O teste apresentou sensibilidade e especificidade de 100 e 98,5%, respectivamente.

[0047]. **Figura 3→**A figura 3 representa o gráfico do resultado do teste de ensaio imuno-enzimático (ELISA indireto) com soros de pacientes comprovadamente portadores de tuberculose ativa ou latente. É possível observar a diferença de valores de absorbância entre soros de indivíduos sadios e dos doentes.

[0048]. **Figura 4→**A figura 4 representa graficamente o kit contendo o antígeno e todas as soluções para a realização do teste diagnóstico por ELISA indireto para tuberculose.

Definições

[0049]. "Mimotopo" se refere a um peptídeo selecionado de bibliotecas randômicas expressas em fagos que mimetiza a estrutura de um epítopo antigênico.

[0050]. O termo "epítopo" se refere a menor porção do antígeno que interage com células ou componentes do sistema imunológico. Enquanto, o termo "antígeno" se refere a qualquer substância contendo epítopos em sua estrutura (ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. Imunologia: Celular e Molecular. 8ed, Elsevier, 2015).

Sumário da Invenção

[0051]. A presente invenção se refere a um peptídeo mimético, obtido pela técnica de *Phage display*, e sintetizado quimicamente para ser utilizado como novo antígeno em um teste sorológico para diagnóstico de tuberculose, doença causada por *M. tuberculosis*. A sequência do peptídeo está expressa nesse documento como SEQ.ID.No.1. Esta invenção reivindica um kit ELISA para imunodiagnóstico da tuberculose humanal utilizando novo antígeno peptídeo mimético sintético P.Mt.PD.7, tampão de lavagem, tampão de bloqueio, tampão de incubação, anticorpo secundário ou proteína conjugado(a) a uma enzima ou marcador, solução reveladora e solução de parada. Assim sendo, a presente invenção pleiteia a proteção do peptídeo P.Mt.PD.7 a ser empregado em diferentes métodos e *kit* de diagnóstico sorológico para tuberculose. O método compreende as seguintes etapas:

a) ligação de anticorpos anti-TB de uma amostra de fluido biológico como sangue, soro, plasma, saliva, urina ou lágrima, a um ou mais polipeptídeos consistindo das sequências de aminoácidos ligados 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-TB na amostra supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligados ao dito anticorpo anti-*M. tuberculosis*.

[0052]. A etapa (a) é realizada mediante o uso do peptídeo P.Mt.PD.7 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 e *linkers*.

[0053]. As etapas (a) e (b) são realizadas mediante a diluição do tampão de lavagem para a concentração de 1x, com água destilada, e do tampão de incubação para a concentração de 1x, com tampão PBS (solução fosfato-salina pH 7,4).

[0054]. A etapa (b) é realizada mediante a adiçãodo anticorpo secundário ou proteína diluídos na proporção de 1:7500 a 1:15000 no tampão de incubação.

[0055]. A etapa (c) é realizada mediante a diluição da solução de parada na proporção de 1:20 na reação.

[0056]. Para a validação do kit e método da presente invenção, foram testados soros de humanos diagnosticados com tuberculose (com diagnóstico confirmado) frente ao antígeno reivindicado nas condições descritas.

REIVINDICAÇÕES

1. PEPTÍDEO P.Mt.PD.7 caracterizado por consistir na sequência SEQ ID Nº: 1.
2. PEPTÍDEO tal qual definido na reivindicação 1, caracterizado por ser sintético ou recombinante e se apresentar como uma sequência isolada, ligada a um carreador como soroalbumina bovina (BSA) ou hemocianina (KLH), ou por estar apresentado em clones de bacteriófagos (fagos).
3. USO DO PEPTÍDEO P.Mt.PD.7 tal qual definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser para o imunodiagnóstico da tuberculose.
4. USO DO PEPTÍDEO P.Mt.PD.7 tal qual definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo emprego do dito peptídeo como antígeno para detecção por meio da presença de anticorpos circulantes (IgT, IgA, IgM, IgG ou IgE) ou outras moléculas ligantes contra a tuberculose humana ou animal, doença ativa ou latente.
5. USO DO PEPTÍDEO P.Mt.PD.7 tal qual definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado pela detecção de moléculas ligantes ao dito peptídeo por ensaios imunológicos tais como os testes imunoenzimáticos (ELISA, Western Blot, imunofluorescência, imunohistoquímica, EIA, MEIA), testes por imunoaglutinação ou sensores eletroquímicos.
6. USO DO PEPTÍDEO P.Mt.PD.7 tal qual definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo emprego do dito peptídeo como ligante a imunoglobulinas presentes no soro, plasma, saliva, lágrima, urina ou moléculas envolvidas direta ou indiretamente no processo de resposta imune.
7. USO DO PEPTÍDEO P.Mt.PD.7 tal qual definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender o preparo de uma composição imunogênica para estimular ou desestimular o sistema imune humano ou animal contra tuberculose humana e animal.

8. COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA contendo peptídeo tal qual definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizada por compreender o dito peptídeo e ao menos um adjuvante fisiologicamente aceitável.
9. MÉTODO PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE UTILIZANDO COMO ANTÍGENO O PEPTÍDEO definido nas reivindicações 1 e 2 caracterizado por compreender as etapas de:

   a) ligação de anticorpos contra *Mycobacterium* de uma amostra de fluido biológico como sangue, soro, plasma, saliva, urina ou lágrima, a sequências de aminoácidos SEQ ID Nº: 1 (P.Mt.PD.7) 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 contra tuberculose na amostra supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligados ao dito anticorpo contra tuberculose.
10. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela realização da etapa (a) mediante o uso do peptídeo sequência SEQ ID Nº: 1 (P.Mt.PD.7) na concentração de 20 a 1000 ng.
11. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela realização da etapa (b) mediante a diluição do anticorpo secundário ou proteína na proporção de 1:7500 até 1:50000 no tampão de incubação.
12. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de a proteína utilizada na etapa (b) ser preferencialmente proteína A ou proteína G.
13. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de a enzima utilizada na etapa (b) ser selecionada do grupo compreendendo peroxidase, fosfatase alcalina, xantina oxidase e penicilinase.

14. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de o marcador utilizado na etapa (b) ser selecionado entre enzimas, radioisótopos, biotina, avidina, neutravidina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.
15. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela realização da etapa (c) mediante detecção do anticorpo secundário ou proteína ligados aos anticorpos contra *Mycobacterium* com reagentes selecionados do grupo pertencente a substratos cromógenos.
16. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de o suporte sólido ser de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno ou poliestireno.
17. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por empregar tampão de lavagem concentrado 15x [NaCl 0,9 % (m/v) + Tween 20 a 0,5 % (m/v)].
18. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por empregar tampão de bloqueio composto de BSA 3 % (m/v) em tampão PBS pH 7,4.
19. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por empregar tampão de incubação concentrado a 15x, composto de caseína em concentração de 2 a 5 % (m/v) em tampão PBS pH 7,4.
20. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por empregar solução reveladora composta de ácido cítrico 0,1 M, Na_2PO_4 0,2 M, OPD 2 mg (em pastilha para ser diluído no momento de uso), e H_2O_2 0,1 %.
21. MÉTODO de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por empregar solução de parada (*stop*) composta de H_2SO_4 5 M.

DESENHOS

Figura 1→

Figura 2→

Sensibilidade
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
100-Especificidade
AUC = 0,999
P < 0,001

Figura 3 →

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Absorbância 492 nm
Soros Negativos
Soros Positivos

Figura 4 →

KIT TUBERCULOSE
Controle +
Controle -
IgG-peroxidase
Lavagem 10x (NaCl 0,09% + 0,05% Tween20) 10 mL
Bloqueio 1x (PBS 7,4 + 2% caseína) 20 mL
Incubação 10x (PBS 7,4 + 0.2% caseína) 20 mL
Solução Reveladora (0.1 M+ Na_2PO_4 0.2 M + OPD 2mg + H_2O_2 0,1%) 15 mL
Stop (H_2SO_4 5M) 20 mL