



IPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020009080-1

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 102020009080-1

(22) Data do Depósito: 07/05/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 09/11/2021

(51) Classificação Internacional: C07K 7/08; G01N 33/569; G01N 33/68.

(54) Título: SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS SINTÉTICAS DE EPIPOPOS LINEARES DE PROTEÍNAS DE MYCOBACTERIUM LEPRAE

(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

(72) Inventor: JULIANA DE MOURA; LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA; JULIANA FERREIRA DE SANTANA; BRUNO ARAUJO SOARES.

Código de Controle: D5D9EF143A175CA8 2F4E47AE3EF5D833

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 07/05/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 20/02/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

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



SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS SINTÉTICAS DE EPITOPOS LINEARES DE PROTEÍNAS DE *Mycobacterium leprae*

Campo da invenção

[001]. A presente invenção está relacionada ao campo da imunologia aplicada à medicina e à saúde humana. Este documento destaca dois peptídeos, aqui denominados de **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2**, caracterizados por compreender sequências lineares de aminoácidos de duas proteínas da bactéria *Mycobacterium leprae* (ML2028 e ML2055) as quais foram modificadas, sintetizadas, carregadas e utilizadas como antígeno para detectar anticorpos de pacientes com hanseníase por meio de imunoensaio as quais compreendem as sequências **SEQ ID NO: 1 GTNVPAEFLENFVHGSGSGC** e **SEQ ID NO: 2 PVSSEAQPGDPNAPSGSGSC**, respectivamente. O cerne desses dois peptídeos aqui descritos são epitopos imunodominantes que, durante sua síntese química foi inserida uma sequência espaçadora compreendida por duas serinas e duas glicinas alternadas, além de um resíduo de cisteína na porção C-terminal. Esta cisteína C-terminal permitiu que esses peptídeos fossem acoplados a uma proteína carreadora e utilizados como antígenos para a identificação de anticorpos anti-*M. leprae* de pacientes com hanseníase.

Fundamentos da invenção

[002]. A hanseníase é uma doença crônica, causada pela infecção pelo bacilo *M. leprae* e caracterizada por gerar espectros imunológicos distintos e opostos, chamados de hanseníase lepromatosa (LL) e hanseníase tuberculóide (TT). Entre estes polos, três formas intermediárias

da doença são encontradas, denominadas de borderline lepromatosa (BL), borderline borderline (BB) e borderline tuberculóide (BT) ¹.

[003] Conforme classificação clínica, os pacientes hansenianos são agrupados de acordo com o número de lesões na pele e a carga bacteriológica. Assim, indivíduos com menos de cinco lesões e baixo número de bacilos são designados como paucibacilares (TT e BT), enquanto os demais são classificados como multibacilares (LL, BB e BL) ². Do ponto de vista imunológico, pacientes multibacilares (MB) possuem resposta predominantemente humoral, do tipo Th2, com alta produção de anticorpos, elevado número de bacilos e progressão da doença. Por outro lado, indivíduos paucibacilares (PB) apresentam resposta mediada por células do tipo Th1, que resulta em baixo título de imunoglobulinas, reduzida carga bacteriológica e resistência à infecção ³.

[004] Embora avanços em direção ao controle da hanseníase tenham sido obtidos nas últimas décadas, cerca de 200.000 novos casos da doença são reportados anualmente indicando que a transmissão do *M. leprae* continua ativa. Dessa forma, estratégias mais robustas de vigilância, com o emprego de técnicas diagnósticas mais sensíveis e específicas, são essenciais à redução do número de infectados ⁴.

[005] Atualmente, o diagnóstico da hanseníase está baseado na avaliação clínica de sinais dermatoneurológicos característicos da doença, existindo, como método de apoio ao exame clínico, a determinação do número de bacilos através de microscopia de amostras de tecidos lesionados (baciloscopia) ⁵. Porém, a utilização destes métodos encontra algumas limitações. Enquanto a avaliação clínica é ineficiente no diagnóstico precoce de indivíduos assintomáticos e dependente de um corpo técnico experiente e treinado, a baciloscopia é pouco sensível para pacientes com baixo número de bacilos ⁶.

[006] Buscando superar essas barreiras, diversos estudos têm proposto testes moleculares, ensaios de quantificação de interferon- γ (INF- γ) ou técnicas sorológicas para o diagnóstico da hanseníase ⁷. Dentre estes, a detecção de imunoglobulina M (IgM) contra o glicolípido fenólico I (PGL-I) de *M. leprae* é o método mais bem estudado, ainda que tenha aplicação limitada em pacientes paucibacilares, levando a um elevado número de falsos negativos ⁸.

[007] Somada à baixa sensibilidade das técnicas existentes, a obtenção e identificação de biomarcadores que possam ser empregados no diagnóstico da hanseníase são dificultadas pela impossibilidade de cultivo do *M. leprae in vitro*. Desta forma, técnicas *in silico* ^{9,10} ou de mapeamento de epitopos, como *phage display* ^{11,12} e *Spot synthesis* ¹³, vêm sendo empregadas como estratégias viáveis para a identificação de peptídeos e proteínas capazes de reconhecer moléculas imunológicas específicas à infecção por *M. leprae*.

[003]. Neste contexto, a invenção aqui descrita trata de duas sequências peptídicas de 15 resíduos de aminoácidos, identificadas pela técnica de *Spot synthesis*, a partir das sequências primárias das proteínas ML2028 e ML2055 de *M. leprae*, e modificadas quimicamente com a adição de uma sequência de resíduos de duas serinas e duas glicinas intercaladas e, ainda, uma cisteína na porção C-terminal resultando em dois peptídeos de vinte aminoácidos caracterizados pelas **SEQ ID NO: 1 GTNVPAEFLENFVHGSGSGC** e **SEQ ID NO: 2 PVSSEAQPGDPNAPSGSGC**, respectivamente. Estas alterações, em conjunto com o acoplamento dos peptídeos a uma proteína carreadora, no caso, a proteína *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH), permitiram a imobilização destes antígenos sobre superfície sólida e a detecção de anticorpos específicos produzidos contra o bacilo *M. leprae*. Além disso, essas modificações possibilitaram índices de sensibilidade e especificidade muito similares

aos obtidos em outros estudos para pacientes multibacilares e paucibacilares.

[009]. São variados os estudos que e referem à identificação de antígenos que reagem com anticorpos produzidos contra proteínas e *M. leprae*. Porém, esses antígenos diferem dos peptídeos aqui descritos em termos de massa molecular, origem e/ou sequência aminoacídica como descrito a seguir.

-Abaixo, são citados os artigos científicos, capítulos de livro, teses e patentes que descrevem antígenos (peptídeos, proteínas recombinantes, antígenos brutos) utilizados na detecção de anticorpos produzidos contra o *M. leprae*, porém que diferem dos peptídeos descritos nesse documento no que se refere à constituição e propriedades bioquímicas e origem.

[010] ALBAN, S. M. et al. Phage display and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e106222, 2014.

[011] BARBOSA, M. S. et al. Recombinant polypeptide of *Mycobacterium leprae* as a potential tool for serological detection of leprosy. **AMB Express**, v. 9, n. 201, 2019.

[012] BOBOSHA, K. et al. Peptides Derived from *Mycobacterium leprae* ML1601c Discriminate Between Leprosy Patients and Healthy Endemic Controls. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

[013] DE SANTANA, J. F. et al. Engineered biomarkers for leprosy diagnosis using labeled and label-free analysis. **Talanta**, v. 187, p. 165–171, 2018.

[014] FERDOSIA, M. et al. Identification of immunotopes against

Mycobacterium leprae as immune targets using PhDTm- 12mer phage display peptide library. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 7, p. 1153–1159, 2015.

[015] GELUK, A. et al. Rational Combination of Peptides Derived from Different *Mycobacterium leprae* Proteins Improves Sensitivity for Immunodiagnosis of *M. leprae* Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 3, p. 522–533, 2008.

[016] GELUK, A.; DUTHIE, M. S.; SPENCER, J. S. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. **Leprosy Review**, v. 82, n. 4, p. 402–421, 2011.

[017] REED, S. G.; DUTHIE, M. S. **Vaccines comprising *Mycobacterium leprae* polypeptides for the prevention, treatment, and diagnosis of leprosy**. CA3036218A1. Depósito: 16 set. 2016. Publicação: 22 mar. 2018.

[018] SAMPAIO, L. H. et al. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 26, p. 1–11, 2011.

[019] SILVA, M. B. R. et al. **Sequência mimética de antígeno de *Mycobacterium leprae* com maior antigenicidade se adsorvida a superfície metálica**. 2015, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150047800, título: "Sequência mimética de antígeno de *Mycobacterium leprae* com maior antigenicidade se adsorvida a superfície metálica", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 04/03/2015.

[020] SPENCER, J. S. et al. Analysis of Antibody Responses to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I, Lipoarabinomannan, and Recombinant Proteins To Define Disease Subtype-Specific Antigenic Profiles in Leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 2, p. 260–267, 2011.

[021] SPENCER, J. S. et al. Identification of serological biomarkers of infection disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 79–89, 2012.

[022] THOMAZ-SOCCOL, V.; ALBAN, S. M.; DE MOURA, J. F. **Uso de Peptídeos Miméticos de *Mycobacterium leprae* para Diagnóstico e Vacinas**. P111063114A2. Depósito: 03 maio 2011. Publicação: 31 jan. 2017.

[023] WANG, H. et al. Detection of antibodies to both *M. leprae* PGL-I and MMP-II to recognize leprosy patients at an early stage of disease progression. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 3, p. 274–277, 2015.

-Artigos científicos, patentes e revisões que foram publicados utilizando a adição do linker GSGS em peptídeos de forma a torná-los mais acessíveis a ligantes. Porém, esses peptídeos são distintos dos descritos nesse documento no que se refere à constituição, origem, especificidade e propriedades bioquímicas.

[024] DE SANTANA, J. F. et al. Engineered biomarkers for leprosy diagnosis using labeled and label-free analysis. **Talanta**, v. 187, p. 165–171, 2018.

[025] DE SANTANA, J. F. et al. Engineered biomarkers for leprosy diagnosis using labeled and label-free analysis. **Talanta**, v. 187, p. 165–171, 2018.

[026] RAHMAN, K. S. et al. Defining species-specific immunodominant B cell epitopes for molecular serology of Chlamydia species. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 22, n. 5, p. 539–552, 2015.

[027] SHEN, Z. et al. Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. ***Anal Chem***, v. 80, n. 6, p. 1910-1917, 2008.

[028] SHANG, Y. et al. Immobilization of a human epidermal growth factor receptor 2 mimotope-derived synthetic peptide on au and its potential application for detection of herceptin in human serum by quartz crystal microbalance. ***Anal Chem***, v. 83, n. 23, p. 8928-8936, 2011.

[029] ROBINSON-MOSHER, A. et al. Dynamics simulation for engineering macromolecular interactions. ***Chaos***, v. 23, n. 2, p. 025110, 2013.

[030] SILVA, M. B. R. et al. **Sequência mimética de antígeno de *Mycobacterium leprae* com maior antigenicidade se adsorvida a superfície metálica**. 2015, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150047800, título: "Sequência mimética de antígeno de *Mycobacterium leprae* com maior antigenicidade se adsorvida a superfície metálica", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 04/03/2015.

-Artigos científicos que reportam a utilização de sequências proteicas sintetizadas sobre membrana (SPOT synthesis) na avaliação da antigenicidade de proteínas frente a anticorpos cujos objetivos e resultados obtidos foram diferentes do descrito no presente documento.

[031] BOTTINO, C. G. et al. Chagas disease-specific antigens: Characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay. ***BMC Infectious Diseases***, v. 13, n. 568, p. 1–10, 2013.

[032] COSTA, M. M. et al. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: Identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 5, p. 2172–2184, 2011.

[033] FRANK, R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. **J Immunol Methods**, v. 267, n. 1, p. 13-26, 2002.

[034] HILPERT, K. et al. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. **Nat Protoc**, v. 2, n. 6, p. 1333-1349, 2007.

[035] VILLARD, S. et al. Peptide decoys selected by phage display block *in vitro* and *in vivo* activity of a human anti-FVIII inhibitor. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 949-952, 2003.

Breve descrição dos desenhos

[036] A Figura 1A representa as sequências primárias da proteína ML2028 sintetizada quimicamente sobre uma membrana de celulose, a partir da técnica de *Spot synthesis*. Em cada spot foram sintetizadas sequências de 15 aminoácidos, cada uma delas sobrepondo-se uma a outra em 12 resíduos até o término da proteína. Na Figura 1B é possível verificar a identificação de epítopos específicos à infecção por *M. leprae* após

incubação da membrana com anticorpos de pacientes hansenianos, seguido de incubação com anticorpos de cabra anti anticorpos humanos e revelação utilizando-se substrato quimioluminescente e filme fotográfico.

[037] A Figura 1C apresenta a análise de densitometria realizada através do software ImageJ, indicando os *spots* com maiores intensidades, os quais referem-se às **SEQ ID NO: 1 GTNVPAEFLNFVHGS****SGSC**.

[038] A Figura 2A representa as sequências primárias da proteína ML2028 sintetizada quimicamente sobre uma membrana de celulose, a partir da técnica de *Spot synthesis*. Em cada spot foram sintetizadas sequências de 15 aminoácidos, cada uma delas sobrepondo-se uma a outra em 12 resíduos até o término da proteína. Na Figura 2B é possível verificar a identificação de epitopos específicos à infecção por *M. leprae* após incubação da membrana com anticorpos de pacientes hansenianos, seguido de incubação com anticorpos de cabra anti anticorpos humanos e revelação utilizando-se substrato quimioluminescente e filme fotográfico. A Figura 2C apresenta a análise de densitometria realizada através do software ImageJ, indicando os *spots* com maiores intensidades, os quais referem-se às **SEQ ID NO: 2 PVSSEAQP****GD****PNAP****SG****SGSC**.

[039] A Figura 3 representa os gráficos comparativos da reatividade dos peptídeos **SEQ ID NO: 1** (Figura 3A) e **SEQ ID NO: 2** (Figura 3B) sintetizados quimicamente na forma solúvel e acoplados à proteína carreadora frente ao soro de voluntários saudáveis, ao soro de indivíduos tuberculosos, ao soro de pacientes paucibacilares e ao soro de pacientes multibacilares pela técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) diluídos a 1:100. A reação antígeno-anticorpo foi detectada, após lavagem, com a incubação de anticorpo anti anticorpo humano conjugado à biotina e revelado com estreptavidina ligada à enzima peroxidase. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

[040] A Figura 4 refere-se aos gráficos das curvas ROC geradas pelo ensaio de ELISA indireto para os peptídeos **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2**. Estas curvas foram utilizadas para determinar os valores de *cutoff*, área abaixo da curva (AUC), sensibilidade (Se) e especificidade (Ep) através do cálculo do valor máximo do coeficiente de Youden. Os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) foram estabelecidos com base nos percentuais de Se e Ep determinados para o respectivo *cutoff* para **SEQ ID NO: 1** e para a **SEQ ID NO: 2**.

[041] A Figura 5 representa gráficos indicativos das porcentagens de inibição produzidas a partir do ELISA de competição realizado entre concentrações crescentes (2-200 μ M) da forma solúvel dos peptídeos **SEQ ID NO: 1** ou **SEQ ID NO: 2** e seus respectivos formatos acoplados a proteína carreadora KLH. A competição foi realizada frente a soros de indivíduos hansenianos a diluição de 1:1000, sendo a reação antígeno-anticorpo detectada, após lavagem, com a incubação de anticorpo anti anticorpo humano conjugado à biotina e revelado com estreptavidina ligada à enzima peroxidase. Um peptídeo inespecífico foi utilizado como controle.

[042] A Figura 6 apresenta o ensaio de Dot Blotting realizado a partir da adsorção do peptídeo **SEQ ID NO: 1**, carregado ao KLH, sobre membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). KLH nativo e KLH modificado pelo *crosslinker* sulfo-SMCC também foram imobilizados sobre as membranas, como controles. *Pools* de soros de indivíduos hansenianos (Figura 6A), sadios (Figura 6B) ou tuberculosos (Figura 6C) foram incubados a diluição de 1:1000 para o peptídeo **SEQ ID NO: 1**. O reconhecimento dos soros pelos peptídeos foi verificado através de reagente quimioluminescente, em equipamento fotodocumentador durante período de exposição de 5 minutos. A Figura 6D representa a análise de densitometria das reatividades do peptídeo **SEQ ID NO: 1** conjugado ao KLH, do KLK nativo e do KLH-SMCC frente aos diferentes *pools* de soros. **** p < 0,0001.

[043] A Figura 7 apresenta o ensaio de Dot Blotting realizado a partir da adsorção do peptídeo **SEQ ID NO: 2**, carregado ao KLH, sobre membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). KLH nativo e KLH modificado pelo *crosslinker* sulfo-SMCC também foram imobilizados sobre as membranas, como controles. *Pools* de soros de indivíduos hansenianos (Figura 7A), sadios (Figura 7B) ou tuberculosos (Figura 7C) foram incubados a diluição de 1:500 para o peptídeo **SEQ ID NO: 2**. O reconhecimento dos soros pelos peptídeos foi verificado através de reagente quimioluminescente, em equipamento fotodocumentador durante período de exposição de 5 minutos. A Figura 7D representa a análise de densitometria das reatividades do peptídeo **SEQ ID NO: 2** conjugado ao KLH, do KLK nativo e do KLH-SMCC frente aos diferentes pools de soros. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Descrição detalhada da tecnologia

[004]. Síntese peptídica sobre suporte sólido (membrana de celulose). Na presente invenção, sequências peptídicas de 15 resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas ML2028 (GenBank accession number: CAA43269.1) e ML2055 (GenBank accession number: P46842) de *M. leprae* foram sintetizadas quimicamente através da técnica de *Spot synthesis* e, posteriormente, testadas por imun química. Nesta estratégia de mapeamento de epitopos, peptídeos com um número de 15 resíduos de aminoácidos foram sintetizados sobre uma membrana de celulose em forma de "spots", utilizando-se equipamento sintetizador automático de peptídeos MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments, Köln, Germany). Em cada *spot* as sequências foram sintetizadas com sobreposição de 12

aminoácidos até atingir a região C-terminal, permitindo o mapeamento completo de cada proteína. A síntese foi realizada de acordo com o descrito por Laune et al. (2002), empregando aminoácidos Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonila) como grupo protetor. Brevemente, uma membrana de celulose de marca Intavis (Bergisch Gladbach, Alemanha) foi inicialmente ativada com uma lavagem de 10 minutos com uma solução de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF) para permitir a ligação do aminoácido a ser adicionado. Após três lavagens com DMF, a membrana foi lavada com azul de bromofenol 0.005% (p/v) em DMF para que os grupamentos amino livres fossem evidenciados pela coloração azul. Para o acoplamento do primeiro aminoácido, este teve seu grupo carboxila ativado com a adição de solução composta de 50 µL de uma solução 1,2 mol.L⁻¹ de diisopropilcarbodiimida (DIPC) e 50 µL de 1,2 mol.L⁻¹ de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) a 100 µL de uma solução 0,6 mol.L⁻¹ do aminoácido Fmoc.

[045] De acordo com a programação do software, cada aminoácido Fmoc com sua porção carboxi ativada foi adicionado ao *spot* correspondente. Após o primeiro acoplamento, a membrana foi retirada do equipamento e lavada três vezes com DMF. Para bloquear os grupos amino livres, estes foram acetilados lavando-se a membrana com uma solução de anidrido acético 10% (v/v) em DMF por 10 min e com DMF posteriormente. Com a lavagem com piperidina 20%, ocorreu nova retirada do grupo protetor Fmoc do aminoácido inicialmente acoplado reiniciando-se, assim o ciclo de síntese. Depois da adição do último aminoácido, a desproteção com piperidina foi realizada anteriormente à acetilação com anidrido acético 10% (v/v) em DMF. Após lavagem da membrana com DMF, os grupos laterais dos aminoácidos, inicialmente protegidos, foram clivados pela adição de ácido trifluoroacético (TFA) e diclorometano na proporção de 1:1 (v/v), contendo 2,5% de trietilsilane, por 60 minutos à temperatura ambiente. A síntese se completou após

realização de três lavagens com diclorometano, seguidas de mais três com DMF e por outras três com ácido acético 1% em água. A ofinal, foram realizadas três lavagens com metanol e secagem à temperatura ambiente, sendo as membranas armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

[046] Avaliação da reatividade dos peptídeos imunodominantes. A reatividade dos peptídeos sintetizados sobre as membranas correspondentes à sequência linear do ML2028 e de ML2055 foi verificada por ensaio imunoquímico, conforme descrição a seguir. Ambas as membranas foram lavadas três vezes com tampão TBS (KCl 0,002 mol/l, Tris 0,05 mol/l em salina, pH 7.4) e incubadas, à temperatura ambiente, sob agitação, por 16 horas com solução de bloqueio contendo 3% de albumina bovina sérica (BSA) dissolvida em TBS-Tween 20 0,1% (TBS-T). Após bloqueio, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com $15\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IgG, previamente precipitadas com sulfato de amônio e dializadas. Esta IgG precipitada foi diluída em TBS-T contendo 0.5% de BSA, à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, e deixada sobre a membrana sob agitação durante 90 minutos. Após três lavagens com TBS-T, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG humana Fc-específica conjugado à enzima peroxidase em diluição 1: 120 000, por 1 hora, 37°C e sob agitação. As membranas foram mantidas sob agitação, à temperatura ambiente por 60 minutos. Após lavagem com TBS-T, a reatividade antígeno-anticorpo foi detectada com a adição de substrato quimioluminescente (Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate) e exposição a filme fotográfico. Após avaliação visual e computacional dos spots reativos através de análise de densitometria utilizando o software ImageJ (v. 1.43, National Institutes of Health, EUA), as membranas foram regeneradas, ou seja, tratadas de forma a eliminar o complexo imunológico. Para reutilização, as membranas foram lavadas por 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com solução A (ureia 8M, SDS 1%, β -mercaptoetanol 0,1%) e por mais 30 minutos, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com solução B (etanol 50%, água destilada 40%, ácido

acético 10%) e, subsequentemente, lavadas com metanol. Após secagem a frio, as membranas permanecem prontas para serem reutilizadas.

[047] Síntese dos peptídeos na forma solúvel. Os epitopos mais antigênicos, representados pelas **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2** foram sintetizados quimicamente na sua forma solúvel e com no mínimo 85% de pureza e pela empresa Aminotech (São Paulo – SP, Brasil). Foram adicionados resíduos espaçadores de serina e glicina alternadamente (SGSG) e uma cisteína na porção C-terminal.

[048] Conjugação dos peptídeos com proteína carreadora. Para tornar os peptídeos mais expostos a anticorpos, os peptídeos foram conjugados a uma proteína denominada de carreador que, normalmente, pode ser BSA, ovalbumina (OVA), KLH, etc., por um método de conjugação via um reagente promotor de ligações covalentes (*crosslinker*), como *m*-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster (MBS), succinimidil 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), sulfo-SMCC, glutaraldeído, entre outros. O protocolo de conjugação seguiu o determinado pelo fornecedor (Thermo Scientific Pierce). Resumidamente, soluções contendo KLH com concentração de 4 mg.mL⁻¹ em PBS foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação com o *crosslinker* sulfo-SMCC (Thermo Scientific - Pierce Chemical Co., Rockford, IL), 20X em excesso molar. Em seguida, moléculas de sulfo-SMCC livres foram removidas através de eluição da solução por uma coluna de dessalinização do tipo PD-10 (Amersham Biosciences), pré-equilibrada com PBS. As frações eluídas foram coletadas e avaliadas quanto à presença de proteínas por leitura das absorvâncias a 280 nm. Apenas as frações mais concentradas foram utilizadas para o acoplamento. Para isto, iguais proporções entre peptídeos e KLH ativado (1:1) foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente e sob agitação. O término da reação de

acoplamento foi induzido pela adição de solução de L-cisteína na concentração final de 1 mM sob agitação durante 20 minutos e à temperatura ambiente. Após o carregamento, os peptídeos conjugados foram submetidos à dosagem de proteína e testados por ELISA frente ao soro de pacientes hansenianos e de voluntários saudáveis, conforme descrito a seguir.

[049] Imunoensaio ELISA com os peptídeos carregados. Microplacas de poliestireno foram sensibilizadas overnight, a 4 °C com 100 µL/poço de solução contendo os peptídeos **SEQ ID NO: 1** ou **SEQ ID NO: 2** acoplados a proteína carreadora KLH, a uma concentração de 10 µg.mL⁻¹ em tampão carbonato 50 mM, pH 9.6. Em seguida, foram realizadas lavagens com solução de lavagem (0.9% NaCl, 0.05% Tween 20) e as placas foram bloqueadas com solução de bloqueio livre de proteínas (Thermo Fisher Scientific) por 1 hora, a 37 °C. Após lavagem, foi realizada incubação com soros de pacientes hansenianos ou de voluntários saudáveis, diluídos a 1:100 em tampão de incubação (0.25% caseína, 0.05% Tween 20 em PBS, pH 7.4), por 1 hora, a 37 °C. As placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo anti-IgG humana conjugado à biotina, a uma diluição de 1:2 500 em tampão de incubação, durante 1 hora, a 37 °C. Na sequência, foram realizadas novas lavagens e incubação com solução de estreptavidina-peroxidase, a 1:10 000 em tampão de incubação, por 1 hora e a 37 °C. As placas foram lavadas e a reatividade dos peptídeos frente aos soros foi verificada pela adição de 100 µL/poço de solução reveladora (0.02% peróxido de hidrogênio, 0.02% o-fenilendiamina (OPD), tampão citrato, pH 5). Após incubação de 15 minutos ao abrigo da luz, a leitura das absorbâncias foi realizada a 490 nm em leitor de microplacas (Biorad).

[050] ELISA de competição com peptídeos solúveis. Microplacas de poliestireno foram sensibilizadas overnight, a 4°C com 100 µL/poço de solução contendo os peptídeos **SEQ ID NO: 1** ou **SEQ ID NO: 2** acoplados

a proteína carreadora KLH, a uma concentração de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão carbonato 50 mM, pH 9.6. Em seguida, foram realizadas lavagens e as placas foram bloqueadas com solução de bloqueio livre de proteínas (Thermo Fisher Scientific) por 1 hora, a 37 °C. Em paralelo, *pools* de soros de pacientes hansenianos ou saudáveis, diluídos a 1:1000 em tampão de incubação, foram pré-incubados com concentrações crescentes (2-200 μM) dos peptídeos **SEQ ID NO: 1**, **SEQ ID NO: 2** ou um peptídeo inespecífico, todos na forma solúvel, por 1 hora, a 37 °C. Após lavagem das placas, os soros, com ou sem pré-incubação, foram adicionados aos poços e mantidos por 1 hora, a 37 °C. As placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo anti-IgG humana conjugado a biotina, a uma diluição de 1:2 500 em tampão de incubação, por 1 hora, a 37 °C. Na sequência, foram realizadas novas lavagens e incubação com solução de estreptavidina-peroxidase, a 1:10 000 em tampão de incubação, por 1 hora e a 37 °C. As placas foram lavadas e a variação das reatividades em função das diferentes concentrações de peptídeos foi verificada utilizando OPD como agente cromogênico. A leitura foi realizada a 490 nm em leitor de microplacas (Biorad).

[051] Imunoensaio Dot Blotting com os peptídeos carreados. Membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), previamente imersas em solução de metanol, foram utilizadas para a imobilização de 0.5 μg dos peptídeos **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2**, carreados com KLH. Como controles, foram utilizados KLH em sua forma nativa e KLH modificado pelo *crosslinker* sulfo-SMCC, em quantidades iguais as dos peptídeos. Para o imunoensaio, as membranas foram inicialmente bloqueadas overnight, à temperatura ambiente e sob agitação com PBS-tween-0.3%. *Pools* de soros de pacientes hansenianos, saudáveis ou tuberculosos foram adicionados a uma diluição de 1:1000, nas membranas contendo o peptídeo **SEQ ID NO: 1**, ou a 1:500, para os ensaios realizados com o peptídeo **SEQ ID NO: 2**.

Após 1 hora de incubação, a 37 °C e sob agitação, as membranas foram lavadas com PBS-tween 0.05% e mantidas em contato por mais 1 hora, 37 °C e sob agitação com anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado a enzima peroxidase, a uma diluição de 1:20 000. Em seguida, as membranas foram lavadas e a revelação foi realizada utilizando o reagente quimioluminescente de detecção de proteínas ECL® (Amersham, GE Healthcare), em equipamento fotodocumentador (Amersham, GE Healthcare) com tempo total de exposição de 5 minutos. As imagens obtidas foram submetidas à análise de densitometria através do software ImageJ (v. 1.43, National Institutes of Health, EUA) para quantificação das reatividades frente aos *pools* de soros. Para reutilização, as membranas foram tratadas durante 30 minutos e a 37 °C com solução de glicina-HCl, pH 2.2 e extensivamente lavadas com PBS.

Exemplos de concretizações da invenção

[052] A presente invenção pode ser melhor compreendida, mas não está limitada, pelos exemplos ilustrados a seguir.

Exemplo 1 – Peptídeos de proteínas de *M. leprae* (ML2028 e ML2055) são reconhecidos por anticorpos de pacientes com hanseníase

[053] O anticorpo é uma molécula proteica secretada pelo linfócito B como uma das respostas do sistema imunológico à invasão por um patógeno. A interação entre antígenos desse patógeno e anticorpos produzidos contra ele permite a neutralização, a ativação do sistema complemento, a aglutinação e eliminação do microrganismo ainda no interior do organismo. Além disso, no que se refere ao diagnóstico sorológico, os anticorpos são um indicativo de que o paciente já entrou em contato com antígenos específicos de um determinado agente etiológico, seja esse contato feito previamente por meio de uma vacina ou pela própria infecção.

[054] Os anticorpos reconhecem regiões muito específicas dos antígenos proteicos que são denominados de epitopos ou determinantes antigênicos. Estas sequências aminoacídicas podem ser compostas por resíduos sequenciais, sendo denominadas de epitopos lineares ou contínuos, ou ainda serem constituídas por resíduos de aminoácidos que se encontram distantes uns dos outros na sequência proteica primária, possuindo apenas proximidade espacial, sendo, portanto, dependentes da conformação da proteína.

[055] Para a identificação dos epitopos lineares das proteínas ML2028 e ML2055 de *M. leprae*, ambas foram sintetizadas quimicamente sobre uma membrana na forma de peptídeos, sendo cada um deles sobrepostos em três resíduos de aminoácidos, cobrindo assim toda a sequência primária das proteínas. Posteriormente, anticorpos provenientes de um grupo de soros de pacientes com hanseníase (n=40) ou de voluntários saudáveis (n=40) foram incubados sobre as membranas. Em etapa seguinte, a incubação com anticorpos de cabra anti anticorpos humanos revelou reatividade específica de três regiões epitópicas nas proteínas ML2028 e ML2055, embora com intensidades diferentes, conforme ilustrado pela Figura 1B e pela Figura 2B, respectivamente.

[056] Aqui tem-se o primeiro exemplo de concretização da invenção, uma vez que anticorpos provenientes de voluntários saudáveis não apresentaram reatividade frente aos peptídeos (sem estarem carregados) quando testados nas mesmas condições descritas para os soros de pacientes hansenianos. Dessa forma, foram identificados dois principais peptídeos, cuja sequência faz parte do cerne dos peptídeos **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2**, objetos deste pedido de patente.

Exemplo 2 – SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 são reconhecidos por soros de pacientes com hanseníase com especificidade e sensibilidade por ELISA indireto

[057] Em posse da sequência dos peptídeos mais reativos das proteínas ML2028 e ML2055 de *M. leprae*, essas foram sintetizadas quimicamente na forma solúvel, com adição de duas serinas e duas glicinas intercaladas (SGSG) e ainda uma cisteína na porção C-terminal. Após a síntese, os peptídeos foram acoplados a uma proteína carreadora e adsorvidos sobre uma placa de poliestireno para realização da análise por ELISA dos soros de pacientes com hanseníase, bem como de voluntários sadios, desta vez de forma individualizada. A reatividade dos soros foi evidenciada pela adição de anticorpos anti anticorpos humanos conjugados à biotina e revelação com estreptavidina conjugada à peroxidase. Os resultados de absorvância dos soros de pacientes hansenianos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) daqueles obtidos com os mesmos peptídeos testados com soros de voluntários sadios, ou seja, houve distinção entre o grupo de pacientes saudáveis e o grupo de pacientes com hanseníase, de acordo com o representado pela Figura 3.

[058] A partir dos dados obtidos nos ensaios de ELISA indireto foi possível determinar a curva ROC para cada peptídeo, como ilustrado na Figura 4. Para ambos os peptídeos, a análise estatística evidencia uma alta capacidade de detecção, com elevados valores de área sob a curva (AUC), sensibilidade (Se) e especificidade (Ep). Outros parâmetros diagnósticos, como os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) foram calculados e também encontram-se na Tabela 1.

[059] Tem-se aqui o segundo exemplo da concretização da invenção uma vez que os soros de pacientes hansenianos reagiram positivamente com peptídeos referentes às sequências **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2** com maior intensidade comparando-se à reatividade obtida com o soro dos voluntários sadios nas mesmas condições. Dessa forma, ambas sequências **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2** apresentaram sensibilidade e especificidade na identificação de soros de pacientes hansenianos e, por isso, são objetos deste pedido de patente.

Tabela 1. Desempenho dos peptídeos **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2** como ferramenta diagnóstica para a hanseníase

Peptídeo	AUC	IC 95%	Se (%)	Ep (%)	VPP (%)	VPN (%)
SEQ ID NO: 1	0.79	0.6763- 0.9038	71.88	78.13	0.04	100
SEQ ID NO: 2	0.8422	0.7506- 0.9339	66.67	97.22	0.31	100

Exemplo 3 – Reatividade das SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 frente aos soros de pacientes hansenianos é específica

[060] Uma vez que os peptídeos foram carregados de forma a melhorar sua exposição aos anticorpos ¹³, foi necessário verificar se havia influência da proteína carreadora sobre a reatividade obtida e se esta era específica aos peptídeos da **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2**. Para isso, um ELISA de competição foi realizado preincubando-se soro de pacientes hansenianos com cada um dos peptídeos sintéticos relativos às sequências **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2**, além de um peptídeo inespecífico, e testando esse mesmo soro em ELISA cuja placa fora adsorvida com as sequências **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2** conjugadas a uma proteína carreadora. Ambos os peptídeos sintéticos referentes às

SEQ ID NO: 1 e **SEQ ID NO: 2** inibiram a ligação dos anticorpos dos pacientes às mesmas sequências carregadas em 67% e 64.2%, respectivamente, enquanto o peptídeo sintético inespecífico inibiu somente ao máximo 37.1% da ligação dos anticorpos dos pacientes às **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2** carregadas, como mostrado na Figura 5. Esse dado indica que a ligação dos anticorpos dos pacientes é específica, não havendo interferência da proteína carreadora nessa reatividade. Sendo este, portanto, o terceiro exemplo da concretização da invenção, justificando este pedido de patente.

Exemplo 4 – SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 são reconhecidas por soros de pacientes hansenianos independentemente do método de ensaio sorológico usado.

[061] Ambos os peptídeos sintéticos referentes às **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2** foram conjugados a proteína carreadora e adsorvidos sobre uma membrana de PVDF na forma de um "dot". Após bloqueio com detergente Tween 20, incubou-se a membrana com soros de pacientes hansenianos, com soros de voluntários sadios ou com soros de indivíduos tuberculosos. Após lavagem, a reatividade foi detectada com a incubação de anticorpos anti anticorpos humanos conjugados à peroxidase e revelação com substrato quimioluminescente em equipamento fotodocumentador. Como pode ser visto na Figura 5 e na Figura 6, os *dots* contendo os peptídeos carregados referentes às sequências **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2**, respectivamente, foram reconhecidos de forma estatisticamente diferente ($p < 0,05$) pelos soros dos pacientes hansenianos, em relação aos soros de voluntários sadios e aos soros de indivíduos tuberculosos. Este resultado respalda a afirmação de que os peptídeos são bons alvos antigênicos para soros de pacientes hansenianos quando testados sobre uma membrana de PVDF e,

portanto, este é o quarto exemplo da concretização da invenção, justificando esse pedido de patente.

Conclusões frente aos exemplos de concretização da invenção

[062] Para a detecção de anticorpos produzidos contra *M. leprae* utilizando-se os peptídeos referentes à **SEQ ID Nº 1** e à **SEQ ID Nº 2**, estes podem ser empregados carreados ou não, individualmente ou combinados entre si como antígenos em métodos sorológicos de ELISA, Dot blotting, Western blotting, aglutinação ou imunocromatografia, os quais podem compreender as seguintes etapas:

- a) adsorção dos peptídeos compreendidos pelas **SEQ ID Nº 1** e **SEQ ID Nº 2** a um suporte sólido;
- b) bloqueio dos sítios de ligação livres com um agente de bloqueio adequado;
- c) reconhecimento dos peptídeos sintéticos aderidos na etapa (a) por anticorpos anti-*M. leprae* presentes em fluidos humanos como soro, por exemplo;
- d) detecção dos anticorpos da etapa (c) por um anticorpo secundário anti anticorpo humano ou uma proteína com afinidade pela porção Fc dos anticorpos, como por exemplo, proteína A ou G, conjugados a um marcador sendo este uma enzima, uma nanopartícula, um agente fluorescente ou biotina;
- e) verificação da presença de anticorpos anti-*M. leprae* através da detecção de sinal produzido pela interação do marcador do anticorpo secundário ou proteína A ou G, ligado aos anticorpos da etapa (a), com um reagente de detecção apropriado.

[063] No que se refere à superfície de adsorção, o suporte sólido utilizado compreende, mas não está restrito a materiais como nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno, PVDF e poliestireno.

[064] No que se refere aos reagentes utilizados para o bloqueio, o agente citado pode ser o mesmo utilizado no estado da arte e pode ser compreendido por, mas não limitado a albumina bovina sérica (BSA), leite em pó desnatado ou seus derivados, como a caseína, e detergentes como Tween 20.

[065] Os anticorpos anti-*M. leprae* são compreendidos por, mas não limitados a, classe das imunoglobulinas G (IgG) e podem ser obtidos a partir de amostras de sangue, soro, plasma, saliva ou outro fluido corporal que contenha anticorpos humanos;

[066] O marcador conjugado ao anticorpo secundário ou às proteínas A e G pode ser uma enzima, um reagente radioisótopo, um agente cromogênio, um fluoróforo, uma nanopartícula, um agente quimioluminescente ou biotina.

Referências

1. Ridley, D. S. & Jopling, W. H. Classification of Leprosy According to Immunity. *Int. J. Lepr.* **34**, 255–273 (1966).
2. WHO. *Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy.* (2018).
3. Yamamura, M. *et al.* Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science (80-.).* **254**, 277–279 (1991).
4. Geluk, A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. *Expert Opin. Med. diagnosis* **7**, 265–274 (2013).
5. Suzuki, K. *et al.* Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives. *J. Dermatol.* **39**, 121–129 (2012).
6. Steinmann, P., Reed, S. G., Mirza, F., Hollingsworth, T. D. & Richardus, J. H. Innovative tools and approaches to end the transmission of *Mycobacterium leprae*. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 298–305 (2017).
7. Nath, I., Saini, C. & Valluri, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic

- challenges. *Clin. Dermatol.* **33**, 90–98 (2015).
8. Spencer, J. S. & Brennan, P. J. The Role of Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid I (PGL-I) in Serodiagnosis and in the Pathogenesis of Leprosy. 344–357 (2011).
 9. Bobosha, K. *et al.* Mycobacterium leprae virulence-associated peptides are indicators of exposure to M . leprae in Brazil , Ethiopia and Nepal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**, 112–123 (2012).
 10. Rana, A., Thakur, S., Bhardwaj, N., Kumar, D. & Akhter, Y. Excavating the surface-associated and secretory proteome of Mycobacterium leprae for identifying vaccines and diagnostic markers relevant immunodominant epitopes. *Pathog. Dis.* **74**, 1–17 (2016).
 11. Alban, S. M. *et al.* Phage display and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. *PLoS One* **9**, e106222 (2014).
 12. Ferdosia, M. *et al.* Identification of immunotopes against Mycobacterium leprae as immune targets using PhDTm- 12mer phage display peptide library. *Trop. J. Pharm. Res.* **14**, 1153–1159 (2015).
 13. de Santana, J. F. *et al.* Engineered biomarkers for leprosy diagnosis using labeled and label-free analysis. *Talanta* **187**, 165–171 (2018).
 14. Laune, D. *et al.* Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J. Immunological Methods* **267**, 53–70 (2002).

REIVINDICAÇÕES

1. Sequências peptídicas sintéticas antigênicas baseadas em dois epítomos imunodominantes de antígenos (ML2028 e ML2055) de *Mycobacterium leprae*, o agente etiológico da hanseníase, caracterizadas por consistirem das sequências aminoacídicas **SEQ ID NO: 1** e **SEQ ID NO: 2**.

2. Sequência peptídica sintética do antígeno ML2028 de *Mycobacterium leprae*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por: consistir de i) uma sequência peptídica **GTNVPAEFLNFVHG**; ii) uma sequência alternada de quatro aminoácidos sendo duas serinas (S) e duas glicinas (G) e, iii) um aminoácido C (cisteína) carboxi-terminal.

3. Sequência peptídica sintética do antígeno ML2055 de *Mycobacterium leprae*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por consistir de: i) uma sequência peptídica **PVSSEAQPGDPNAPS**; ii) uma sequência alternada de quatro aminoácidos sendo duas serinas (S) e duas glicinas (G) e, iii) um aminoácido C (cisteína) carboxi-terminal.

4. Sequências peptídicas sintéticas de antígenos (ML2028 e ML2055) de *Mycobacterium leprae* definidas pelas reivindicações 1, 2 e 3 caracterizadas por serem antigênicas ao serem conjugadas à proteína carreadora hemocianina de caramujo ou KLH (do inglês *keyhole limpet hemocyanin*).

5. Uso das sequências peptídicas sintéticas de antígenos (ML2028 e ML2055) de *Mycobacterium leprae*, definidas pelas reivindicações 1, 2, 3 e 4 caracterizadas por serem usadas em ensaios imunológicos/sorológicos para identificação de anticorpos produzidos contra o bacilo causador da hanseníase.

DESENHOS

Figura 1

A



B



C

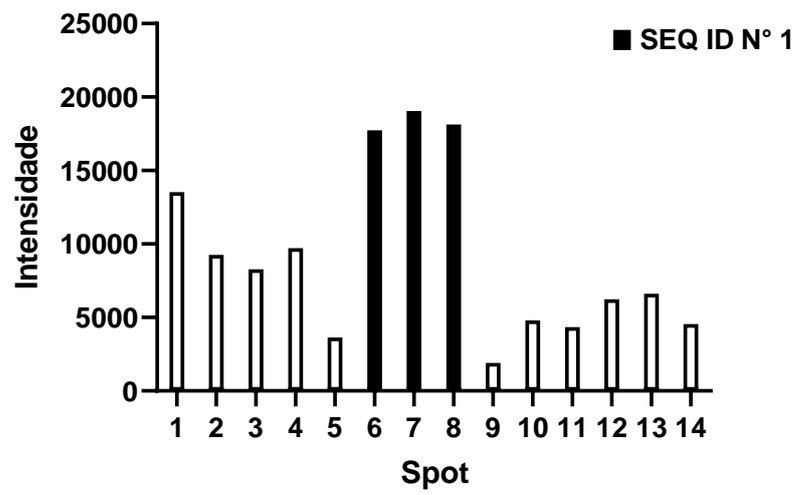


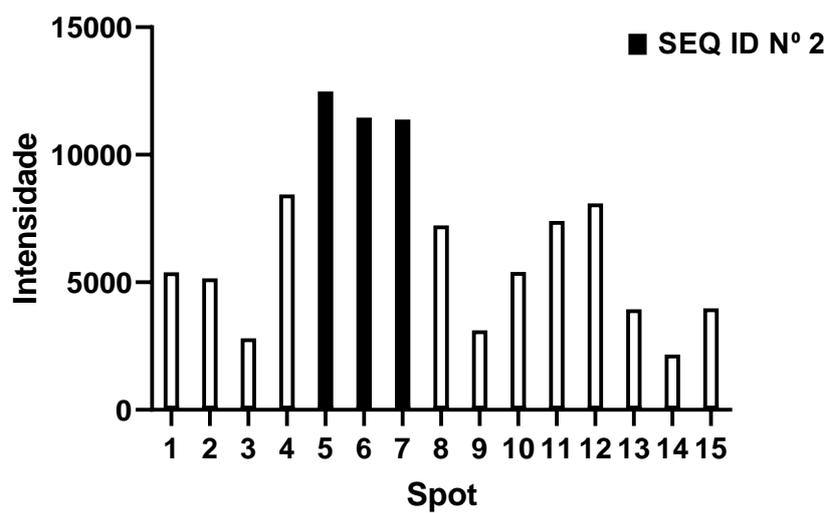
Figura 2**A****B****C**

Figura 3

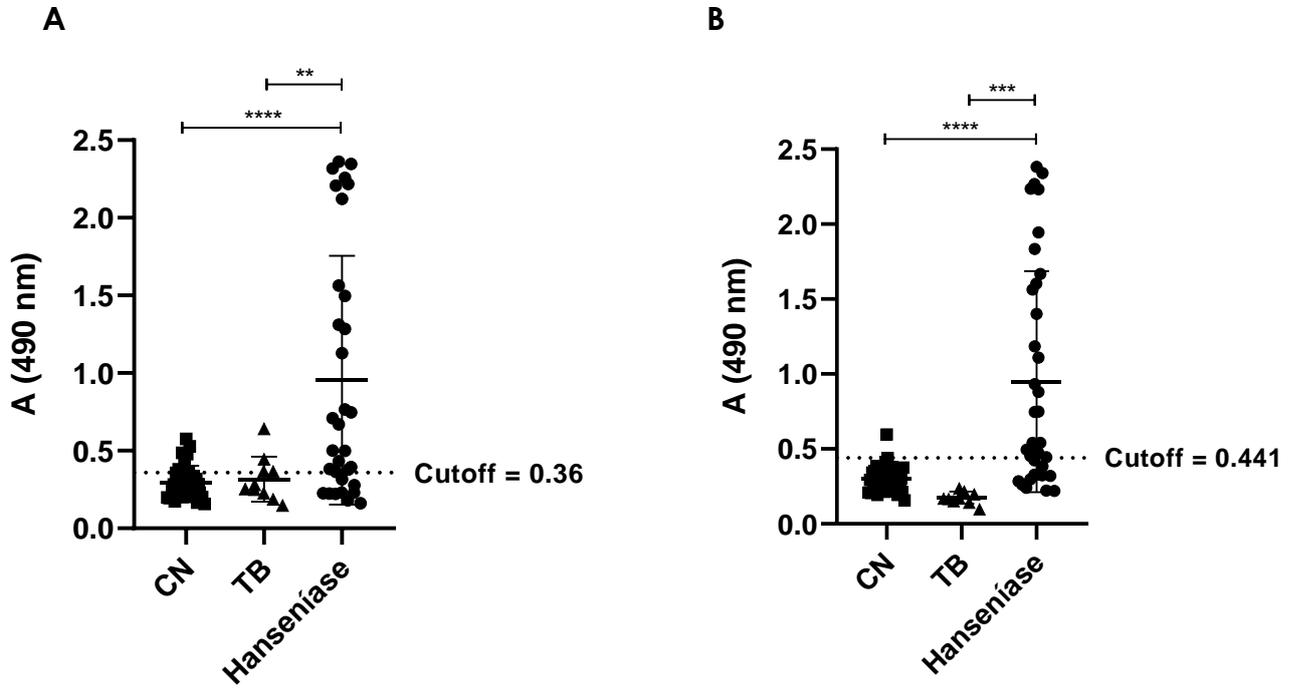


Figura 4

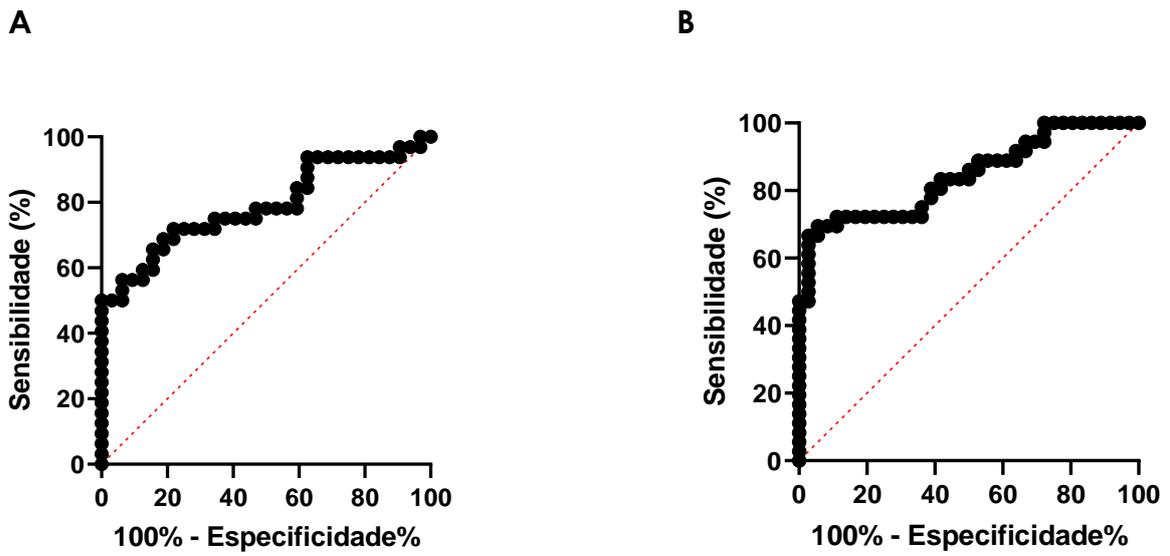


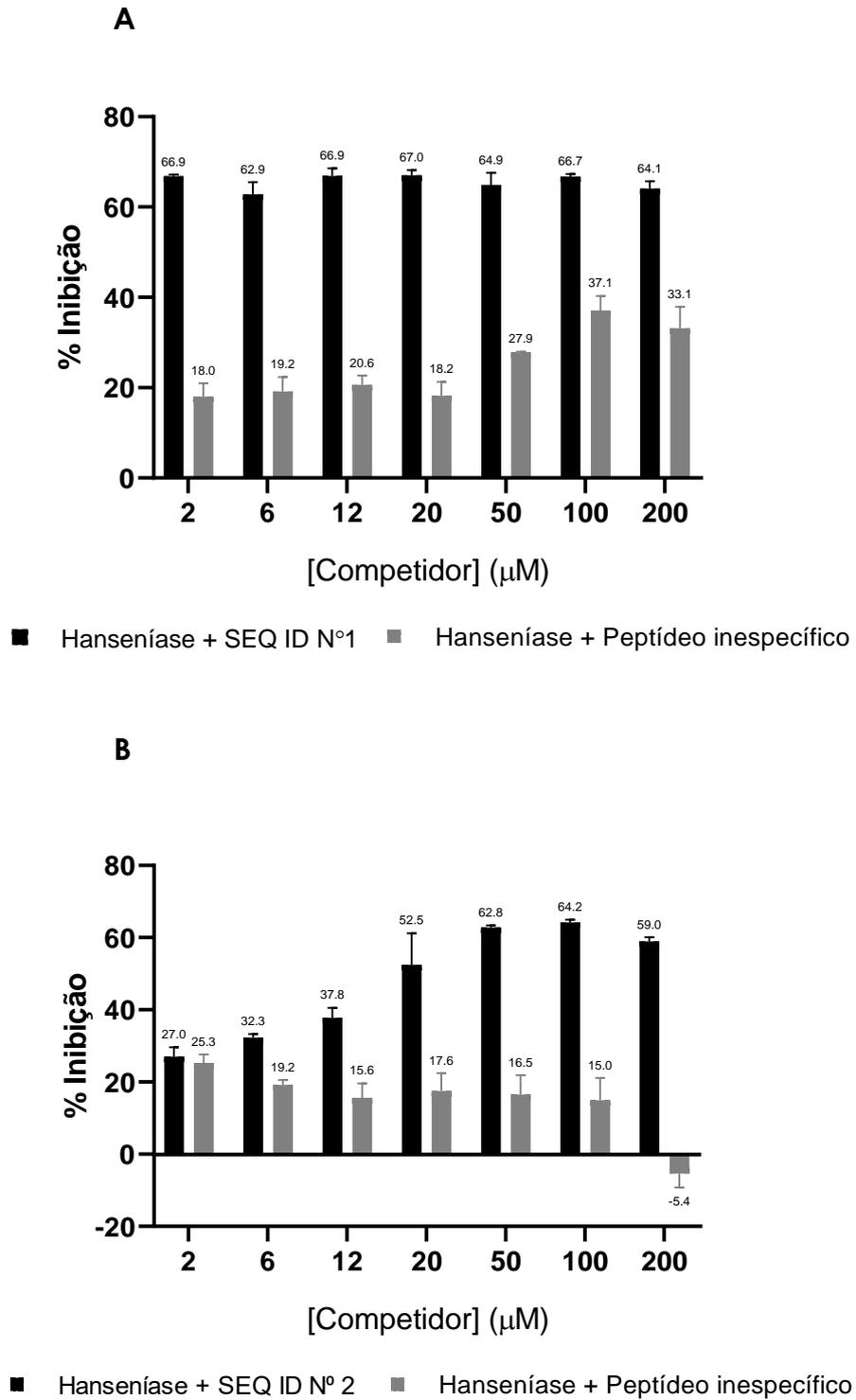
Figura 5

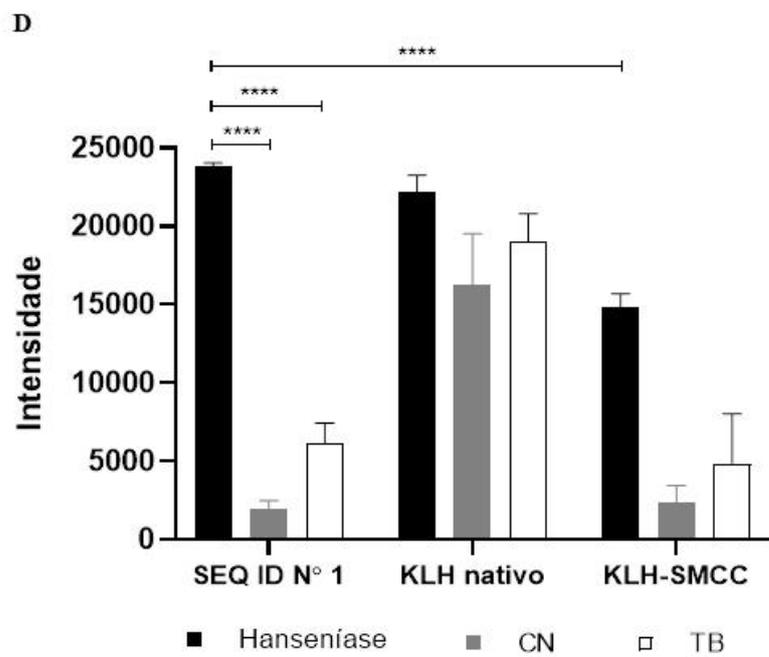
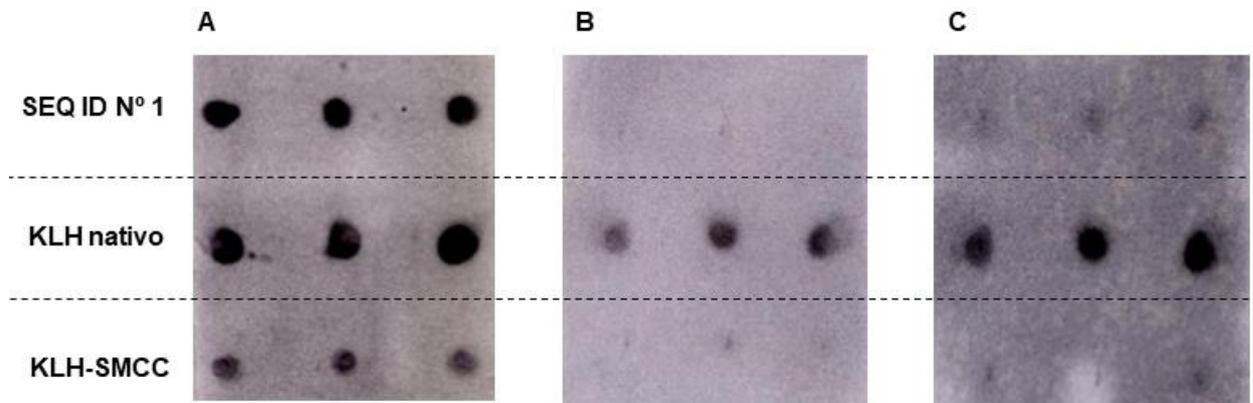
Figura 6

Figura 7