



INPI
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 102024003565-8

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.

(21) Número do Depósito: BR 102024003565-8

(22) Data do Depósito: 23/02/2024

(43) Data da Publicação Nacional: 24/04/2025

(51) Classificação Internacional: C07K 7/08; C07K 14/35; A61K 39/04; G01N 33/53; A61P 31/08.

(54) Título: PEPTÍDEO ENGENHEIRADO P.ML.85B.1 E MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE HANSENÍASE

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA XV DE NOVEMBRO, 1299 - CENTRO, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80060-000, Brasileira

(72) Inventor: RAPHAEL APARECIDO BOSCHERO; VANETE THOMAZ SOCCOL; MANUEL HOSPINAL SANTIANI; ROCÍO DEL PILAR CUASPA ROPAÍN; CARLOS RICARDO SOCCOL.

Código de Controle: 0E2C344252817242 712290AA1922C4DD

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 23/02/2024, observadas as condições legais

Expedida em: 19/05/2026

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

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

RELATÓRIO DESCRITIVO

PEPTÍDEO ENGENHEIRADO P.MI.85B.1 E MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE HANSENÍASE

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção reivindica o peptídeo P.MI.85B.1 (SEQ. ID. NO:1 para aplicação no diagnóstico sorológico de hanseníase. Incluindo a sequência de aminoácido do antígeno e o uso deste em métodos sorológicos para diagnóstico de hanseníase.

Fundamentos da Invenção e Descrição do Estado da Técnica

[002]. A hanseníase é uma doença crônica infecciosa, também conhecida como doença de Hansen, devido ao descobridor do microrganismo que causa a doença. A infecção é causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool ácido resistente, de multiplicação lenta e não cultivável em condições de laboratório. A doença é considerada endêmica em países tropicais e um desafio para a saúde pública mundial. O Brasil é o 2º país com maior prevalência, depois da Índia, com aproximadamente 17.979 dos 127.396 novos casos no mundo em 2020. Ela representa 8,49 casos por cada 100.000 habitantes, com maior número de casos nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte (Ministério da Saúde, BRASIL. Boletim Epidemiológico de Hanseníase. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – DCCI. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletimepidemiologico-de-hansenia-se_-25-01-2022.pdf. Acessado 21/03/2023).

[003]. A principal forma de infecção do bacilo dá-se por contato direto com indivíduos acometidos pela hanseníase multibacilar. A via de entrada do microrganismo dá-se pelas vias aéreas e sua disseminação pela via hematogênica e posteriormente para pele, mucosas, nervos periféricos e outros tecidos. Existe evidência de indivíduos com maior suscetibilidade que outros dado por condições genéticas, ambientais e comportamentais, considerando que a incubação pode demorar até 20 anos ou mais (ZHAO M.L., LIU H., ZHANG F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. *Frontiers in Immunology* 11. 2020).

[004]. A doença apresenta uma ampla variação de manifestações clínicas, sendo que de um extremo possui uma forte reação imune celular, poucas lesões visíveis na pele, quantidade de bacilo de *M. leprae* baixo ou indetectável; e do outro extremo tem pacientes que apresentam altas cargas de *M. leprae*, múltiplas lesões na pele, alta resposta imune humoral, acometimento do trato respiratório superior, olhos, nódulos linfáticos, testículos, órgãos internos, neuropatia que pode causar disfunção e incapacidade grave (Chen KH., Lin C, Shih-Bin Su, Kow-Tong Chen. Leprosy: A Review of Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Management. *Journal of Tropical Medicine*. 2022). Podendo existir formas intermediárias de apresentação clínica. A primeira classificação da doença foi dada por Ridley-Jopling em 1966 com cinco formas clínicas. Atualmente usa-se a classificação dada pela Organização Mundial da Saúde em 1987, que abrevia os critérios de classificação em duas formas: Paucibacilar (PB), quando apresenta entre 1 e 5 lesões cutâneas, e Multibacilar (MB), quando apresenta mais do que 5 lesões (World Health Organization). Estratégia Global de Hanseníase 2021–2030: Rumo à zero hanseníase. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/pt/publications/i/item/9789290228509>, acessado 21/03/2023).

[005]. O diagnóstico de hanseníase é feito principalmente pelos achados clínicos no exame das lesões cutâneas, avaliação do envolvimento neural e capacidade de mobilidade. Em casos de difícil resolução é feito um exame bacteriológico com esfregaço de pele, e é recomendado uma biopsia de pele para estudo histopatológico e teste molecular por reação da cadeia da polimerase, mas esses exames requerem a disponibilidade de estrutura para pesquisa (ALBAN SM, SELLA SRBR, MIRANDA RN, MIRA MT, THOMAZ-SOCCOL V: PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis as a tool for *Mycobacterium* species identification in lepromas for lepromin production. *Lepr Rev.* 2009, 80: 129-142).

[006]. Os testes de sorologia disponíveis contam com limitada utilidade, tendo em vista que indivíduos saudáveis podem apresentar resultado positivo provavelmente em resposta à presença de outros microrganismos relacionados ao gênero *Mycobacterium*, como *M. tuberculosis*. No entanto, casos confirmados, especialmente para PB, podem apresentar resultado negativo provavelmente relacionado à grande variabilidade de fatores genéticos e ambientais da resposta imunológica. No entanto, o teste sorológico apresenta alta sensibilidade para casos MB (ALBAN, S.M., MOURA, J.F., MINOZZO, J.C. *et al.* Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. *BMC Infect Dis* **13**, 42, 2013; Ministério da Saúde, BRASIL, Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase -PCDT. Brasília: Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde – SCTIIE, Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde – DGITIS. 2022. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_terapeuticas_hanseniose.pdf, acessado 21/03/2023; MAYMONE MBC., LAUGHTER M., VENKATESH S., *et al.*, 2020. Leprosy: Clinical aspects and

diagnostic techniques. Journal of the American Academy of Dermatology 83, 1, 1-14)

[007]. O tratamento da doença é feito por poliquimioterapia com uso de antibióticos durante seis meses para apresentação da doença PB, e de 12 meses para MB, que resultam na eliminação eficiente do microrganismo no paciente. Apesar de ser uma das primeiras doenças de que se tem relato na história da humanidade, ainda enfrenta muitos desafios para ser erradicada. Entre os desafios que ainda enfrenta a erradicação da doença estão: o desconhecimento do mecanismo de patogenicidade do microrganismo para invadir o corpo do paciente escapando ao sistema imune; longo período de incubação do microrganismo dentro do organismo antes de evidenciar sinais clínicos; estigma social e discriminação das pessoas, famílias e até populações infectadas; e dificuldades no diagnóstico precoce devido à falta de testes eficientes, rápido e de custo acessível.

[008]. O nosso grupo de pesquisa vem trabalhando desde 2006 com abordagens para hanseníase além de outras doenças infecciosas, com o uso de técnicas moleculares de diagnóstico (ALBAN SM, SELLA SRBR, MIRANDA RN, MIRA MT, THOMAZ-SOCCOL V: PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis as a tool for Mycobacterium species identification in lepromas for lepromin production. Lepr Rev. 2009, 80: 129-142), a identificação de mimotopos aleatórios (ALBAN, S.M., DE MOURA, J.F., MINOZZO, J.C. et al. Identification of mimotopes of *M. leprae* as potential diagnostic reagents. BMC Infect Dis 13, 42, 2013), uso de phage-display para testes serológicos (ALBAN SM, DE MOURA JF, THOMAZ-SOCCOL V, SÉKULA SB, ALVARENGA LM, MIRA MT, et al. (2014) Phage Display and Synthetic Peptides as Promising Biotechnological Tools for the Serological Diagnosis of Leprosy. PLoS ONE 9(8): e106222), desenvolvimento de testes com imunossensores (DE SANTANA JF., DA SILVA M.R.B, PICHETH G., YAMANAKA, I. Engineered biomarkers for leprosy

diagnosis using labeled and label-free analysis. *Talanta* 187, 165-171 (2018)) e uso de imunoinformática para mapeamento de epítomos (SOARES B.A., TEIXEIRA K. N., DE SANTANA JF., ASSIS B.L.M., et al., Epitope mapping from *Mycobacterium leprae* proteins: Convergent data from *in silico* and *in vitro* approaches for serodiagnosis of leprosy. *Molecular Immunology* 138, 48-57 (2021)), demonstrando ampla abrangência no desenvolvimento em métodos diagnósticos.

[009]. Em análise do estado da técnica foram encontrados artigos e patentes sobre o tema. A patente no. BR 10 2018 075075 5 A2, trabalha com diagnóstico em biologia molecular e reivindica iniciadores, kit e método para diagnóstico de hanseníase (ASSUNÇÃO, C. B.; MACHADO, A. S.; CALIGIORNE, R. B.; CARVALHO, J. B. F. INICIADORES, KIT E MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HANSENÍASE, E USOS. Depositante: Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. BR1020180750755. Depósito em: 03 dez. 2018). O diagnóstico por técnicas associadas a espectrometria de massas identificando biomarcadores foram também exploradas em documentos patentários (PONTAROLO, R.; TORRES, R. T.; FRANCISCO, T. M. G. Processo de identificação da hanseníase através de fluídos biológicos em humanos e animais. Depositante: Universidade Federal do Paraná. BR1020170043266. Depósito em: 03 mar. 2017; ESTEVES, C. Z.; OLIVEIRA, D. N.; MACEDO, C. S.; NERY, J. A. C.; PESSOLANI, M. C. V.; SARNO, E. N. Método de detecção e identificação de biomarcador(es) lipídico(s) específico(s) para hanseníase. Depositante: Universidade Estadual de Campinas. BR1020150216726. Depósito em: 04 set. 2015. Concessão em: 09 mar. 2021). Estas patentes se diferenciam do presente invento por **não se tratar da mesma metodologia** de uso e pelas sequências dos antígenos sintéticos aqui reivindicados serem diferentes.

[010]. Com relação aos diagnósticos sorológicos para hanseníase as patentes que usam proteína recombinante e são reivindicadas para diagnóstico e vacina temos a patente BR 10 2018

073883 6 A2 (MARCHIORO, S. B.; SIMIONATTO, S.; BORSUK, S.; BARBOSA, M. S.; MOTTA, M. L. L.; GRASSMANN, A. A. Polipeptídeo recombinante de epítomos de *Mycobacterium leprae*. Depositante: Universidade Federal da Grande Dourados. BR1020180738836. Depósito em: 21 nov. 2018). No entanto, os antígenos diferem dos aqui reivindicados no invento pelas sequências aqui apresentadas serem diferentes.

[011]. Também foram encontradas patentes para diagnósticos sorológicos com peptídeo sendo usados como antígeno para hanseníase. Dentre elas citam-se: **PI 1106311-4 A8** (THOMAZ-SOCCOL, V.; MOURA J.F. Uso de peptídeos miméticos de *Mycobacterium leprae* para diagnóstico e vacinas. Depositante: Universidade Federal do Paraná. PI11063114. Depósito em: 03 maio 2011), trata-se de peptídeos obtidos pela técnica de phage display com potencial para diagnóstico sorológico. Todavia, as sequências dos peptídeos diferem das do presente evento. A patente **BR 10 2014 003636 9** (NAHAS, A. A.; LIMA, M. IS.; CAPPARELLI, F.E.; LOBATO, J.; OLIVEIRA, J.D.D. Peptídeos recombinantes miméticos a antígenos da *M. leprae* e suas aplicações diagnósticas e imunogênicas. Depositante: Universidade Federal de Uberlândia. Depósito em: 14 fev. 2014. Concessão em: 06 dez. 2022). Usa peptídeos como antígenos para diagnóstico sorológico, mas a comparação das sequências não é idêntica. Na busca feita usando a ferramenta Blast não foram encontrados documentos que antecipassem os peptídeos aqui descritos (P.MI.LSR2.1; P.MI.10Kda chaperonin.1; P.MI.18Kda.1; P.MI.85B.1; P.MI.85B.2).

[012]. Foram também encontrados o uso de peptídeo para diagnóstico imunoeletróquímico (MOURA, J.; FARIA, R. C.; ALMEIDA, S. V.; RIBEIRO, C. Z. Dispositivo microfluídico para diagnóstico sorológico de hanseníase e método para magneto-imunoensaio eletróquímico baseado no uso de mimotopo da *Mycobacterium leprae* para diagnóstico sorológico de hanseníase. BR1020210149205. Depositantes:

Fundação Universidade Federal de São Carlos e Universidade Federal do Paraná. Depósito: 28 jul. 2021). Patentes aplicando peptídeo epítopo linear modificado com tag (MOURA, J.; ALVARENGA, L.M.; / SANTANA, J. F.; SOARES, B. A. Sequências peptídicas sintéticas de epítomos lineares de proteínas de *M. leprae* e seu uso. BR1020200090801. Depositante: Universidade Federal do Paraná. Depósito: 07 maio 2020). Também peptídeo epítopo linear modificado com tag para adsorção em superfície metálica aplicado a diagnóstico sorológico (SILVA, M. B. R.; ALVARENGA, L. M.; FREITAS, R. A.; MOURA, J. F.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PICHETH, G. F.; ALLBAN, S. M.; SANTANA, J. F. Sequência peptídica mimética de antígeno de *M. leprae* com maior antigenicidade se adsorvida a superfície metálica. BR1020150047800. Depositante: Universidade Federal do Paraná. Depósito em: 04 mar. 2015. Concessão em: 04 maio 2021). No entanto, não foram encontrados documentos que antecipassem os peptídeos aqui reivindicados e obtidos por uma plataforma que envolveu análise in silico, imunodeteção e teste ELISA para aplicações no diagnóstico da hanseníase para pacientes pauci e multibacilares.

Descrição da abordagem do problema técnico

[013]. A problemática da hanseníase para o sistema de saúde, na grande maioria das vezes, é o diagnóstico que geralmente é baseado em sinais e sintomas clínicos. Por vezes é acompanhado por exame baciloscópico, dada a dificuldade de acesso às metodologias mais recentes pelos pacientes acometidos da doença. Estudiosos do assunto defendem que, além da baciloscopia, outros testes diagnósticos como a histopatologia, técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaios imunológicos (resposta humoral e celular) deveriam ser empregados concomitantemente ao exame clínico (ASEFFA A. *et al.* Lepr. Rev., 76: 147-159, 2005). A avaliação da resposta imune celular do

indivíduo frente a *M. leprae* é realizada pelo teste de Mitsuda (GODAL T. *Prog. Allergy*, 25: 211-242, 1978). O teste consiste na aplicação intradérmica da mitsudina, também chamada de lepromina, na face anterior do antebraço (TOMIMORI-YAMASHITA J. *et al. An. Bras. Dermatol.*, 71: 343-349, 1996). A reação de Mitsuda positiva está associada à forma tuberculóide (resistência ao *M. leprae*), e a reação negativa à forma lepromatosa da doença (susceptibilidade ao *M. leprae*) (OPROMOLLA D.V.A. Classificação. In: Opromolla D.V.A. *Noções de hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p. 47-50). A mitsudina é uma suspensão de bacilos inativados obtidos de biopsia de pacientes que se encontram na forma clínica lepromatosa ou de tatus (*Dasypus novemcinctus*) infectados experimentalmente (BEIGUELMAN B. *Cien. Saúde Colet.*, 7: 117-128, 2002), uma vez que o *M. leprae* não é cultivável *in vitro* (Scollar D. M. *et al. Clin. Microbiol. Rev.*, 19: 338-381, 2006).

[014]. A mitsudina não pode ser mais utilizada como diagnóstico, pois contêm muitos determinantes antigênicos comuns a outras espécies de micobactérias, o que resulta em inespecificidade (GELUK A. *et al. Infect. Immun.*, 70: 2544-2548, 2000) e em resultados falso-positivos em indivíduos saudáveis (BRAHMBHATT S. *et al. Clin. Exp. Immunol.*, 128: 140-148, 2002).

[015]. O único teste para o diagnóstico imunológico disponível para é a detecção de anticorpos anti-PGL-I (glicolípido fenólico I) por teste ELISA, teste *dipstick* ou teste de fluxo lateral (ML Flow Test) (OSKAM L., SLIM E., BÜHRER-SÉKULA S. *Lepr. Rev.*, 74: 196-205, 2003; Aseffa A. *et al. Lepr. Rev.*, 76: 147-159, 2005). O ensaio pode detectar anticorpos na maioria dos pacientes multibacilares, mas tem valor limitado na identificação de pacientes paucibacilares e seus contatos (GELUK A. *et al. Infect. Immun.*, 73: 5636-5644, 2005).

[016]. O desenvolvimento de insumos que permitam o diagnóstico

precoce da hanseníase com maior sensibilidade e acurácia é extremamente desejado. Pois, pacientes diagnosticados e tratados tardiamente podem apresentar incapacidades físicas e deformidades que podem levar a diminuição da capacidade de trabalho, limitação da vida social e problemas psicológicos. Além disso, o diagnóstico precoce interrompe a transmissão do microrganismo, fazendo com que seja possível melhor controle da doença. Aqui são descritas novas sequências antigênicas e que foram capazes de diferenciar indivíduos negativas de positivas para hanseníase por imunodiagnóstico.

Descrição detalhada da Invenção

[017]. A presente invenção descreve peptídeos sintéticos selecionados por análise *in silico* e *in vitro*.

[018]. Os exemplos apresentados abaixo demonstram a obtenção do antígeno e sua validação e seu uso em hanseníase:

Exemplo 1: Obtenção de antígenos peptídicos *in silico*

[019]. Novos antígenos peptídicos de *M. leprae* foram obtidos utilizando ferramentas *in silico*, avaliando proteínas conhecidamente imunogênicas de *M. leprae*. Para isto, foram identificadas proteínas antigênicas publicadas na base de dados da plataforma IEDB, Immune Epitope Database (VITA R, MAHAJAN S, OVERTON JA, DHANDA SK, MARTINI S, CANTRELL JR, WHEELER DK, SETTE A, PETERS B. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. Nucleic Acids Res. 2018). Regiões antigênicas nestas proteínas foram mapeadas utilizando epítomos conhecidos e preditos por metodologia *in silico*. Após a seleção dos peptídeos antigênicos uma sequência de aminoácidos foi adicionada para conferir hidrofiliidade e sítio de ligação. Após a seleção os peptídeos foram sintetizados quimicamente, quantificados e validados.

[020]. No banco de dados da plataforma IEDB foram buscados epítomos provenientes do organismo *M. leprae* e que apresentassem resultados in vitro/in vivo positivos para ensaios relacionados a linfócitos B com amostras provenientes de humanos. Ao todo, sete proteínas se destacaram com antígenos: LSR2 (34 epítomos); 10 kDa chaperonin (30 epítomos); 18 kDa antigen (23 epítomos); Antigen 85-B precursor (16 epítomos); 65 kd antigen (7 epítomos); ESAT-6-like protein esxB (4 epítomos); e heat shock protein 70, hsp70A2 (2 epítomos). As proteínas com mais de 10 epítomos positivos foram selecionadas (LSR2, 10 kDa chaperonin, 18 kDa antigen e Antigen 85-B precursor). Os epítomos identificados na plataforma (epítomos conhecidos) foram mapeados ao longo da sequência de aminoácido de cada proteína.

[021]. A partir da sequência de aminoácidos de cada proteína foram realizadas predição de epítomos utilizando as ferramentas in silico para predição de acessibilidade, antigenicidade (Bepipred 2.0 e ABCpred), hidrofiliidade e epítomos descontínuos (DicoTope e EliPro). Para análise de epítomos descontínuos foram primeiramente determinadas as estruturas secundárias e terciárias das proteínas através da ferramenta de modelagem molecular SWISS-Model [WATERHOUSE, A., BERTONI, M., BIENERT, S., et al., SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Res. n 46, 2018].

[022]. Pontuações foram atribuídas individualmente para cada aminoácido ao longo das proteínas quanto a ausência (0) ou presença (1) de: epítomos conhecidos identificados no IEDB; em cada análise de predição in silico; e epítomos presentes em peptídeos identificados previamente pela técnica de Phage Display no mesmo grupo de trabalho. A soma da pontuação para cada aminoácido gerou um ranking de sequências curtas com maiores pontuações. Ou seja, com maiores chances de serem antigênicas considerando a estratégia utilizada. Peptídeos foram desenhados baseados nessas sequências

identificadas como antigênicas. Os peptídeos foram selecionados quanto aos que apresentassem maior especificidade para *M. leprae* em análises de homologia (BLASTp). Ao todo cinco peptídeos foram selecionados, sendo dois provenientes da proteína 85-B e um de cada uma das outras três proteínas selecionadas. Os peptídeos foram denominados P.MI.LSR2.1, P.MI.10Kdachaperonin.1, P.MI.18Kda.1, P.MI.85B.1 e P.MI.85B.2. A Figura 1 mostra a conformação tridimensional dos peptídeos desenhados.

[023]. Para garantir solubilidade dos peptídeos foram adicionadas sequências de lisina-lisina-glicina (KKG) no N-terminal de cada peptídeo. Além da adição de um aminoácido cisteína (CKKG) para conferir um grupo funcional sulfidril (-SH) nos peptídeos, possibilitando futura conjugação dos mesmos em moléculas carreadoras.

[024]. As sequências de aminoácidos dos peptídeos foram avaliadas quanto à similaridade com sequências apresentando proteção patentária (Tabela 1) e sequências de organismos do complexo *M. tuberculosis* (Tabela 2). A ferramenta de homologia BLASTp disponível na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi utilizada para a análise de similaridade (ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997). A busca foi realizada nos bancos de dados de patentes e de sequências não redundantes. Não foram encontradas patentes onde há a proteção dessas sequências, a maior similaridade foi encontrada para o peptídeo P.MI.85B.1. Não foram encontradas sequências homólogas (100% cobertura e 100% identidade) comparando com sequências do complexo *M. tuberculosis*, a maior similaridade encontrada foi para o peptídeo P.MI.18Kda.1.

[025]. Tabela 1 – Análise de similaridade com sequências protegidas

Peptídeo	Cobertura (%)	Patente mais similar
P.MI.LSR2.1	71	US7538206
P.MI.10Kda chaperonin.1	66	US9340577
P.MI.18Kda.1	71	WO8905825
P.MI.85B.1	83	US6506389
P.MI.85B.2	71	US6506389

[026]. Tabela 2 – Análise de similaridade com sequências de organismos do complexo *M. tuberculosis* (tax ID 77643)

Peptídeo	Cobertura (%)	Identidade (%)
P.MI.LSR2.1	90	88,89
P.MI.10Kda chaperonin.1	100	75,0
P.MI.18Kda.1	100	90,0
P.MI.85B.1	100	85,71
P.MI.85B.2	100	80,0

[027]. As sequências de peptídeos selecionados e modificadas foram sintetizadas quimicamente aplicando-se o método de síntese de peptídeos ancorados em uma matriz sólida (MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. Journal of the American Chemical Society, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1963). Utilizou-se a resina rink amine resin e aminoácidos apresentando grupo protetor Fmoc para síntese em um sintetizador semiautomático de peptídeos (ResPep SL, Intavis Bioanalytical Instruments) em escala de 5 µmol.

[028]. Após a síntese, os peptídeos foram clivados do suporte da matriz e desprotegidos quimicamente por incubação à temperatura ambiente durante 4 h sob agitação com solução de ácido trifluoroacético (TFA) 92,5% (v/v), água ultrapura 2,5% (v/v), triisopropilsilano 2,5% (v/v) e β -Mercaptoetanol 2,5% (v/v). Os peptídeos solúveis foram então recuperados passando por um filtro de seringa para reter o a resina. As soluções de peptídeos foram purificadas por precipitação em solvente, aplicando três ciclos repetidos de ressuspensão em éter terc-butil-metílico frio (-20 °C) (20 mL cada) e centrifugação (30 min, 4000 g, a 4 °C). Os peptídeos foram deixados para secar (cerca de 5 min) à temperatura ambiente e ressuspensos em água ultrapura esterilizada (1-2 mL). As soluções aquosas de peptídeos foram congeladas a -80 °C durante a noite e liofilizadas por 24 h. Os peptídeos foram solubilizados em água ultrapura esterilizada, esterilizados por filtração por membrana (poro de 0,22 μ m, material PES) e armazenados em alíquotas a -20 °C.

Exemplo 2: Padronização da aplicação dos antígenos em método diagnóstico por teste ELISA

[029]. Uma vez obtidos os novos antígenos, foi requisitado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná a utilização de um banco de soros pré-existente de projetos anteriores para serem aplicados no estudo dos novos antígenos aqui propostos. O pedido foi aceito e protocolado sob o número CAAE 37297320.4.0000.0102 e parecer 4.421.856.

[030]. Os cinco peptídeos solubilizados foram quantificados quanto a proteína total (Tabela 3). Em seguida, os peptídeos foram avaliados quanto a sua capacidade de reconhecer anticorpos contra *M. leprae* em teste sorológico utilizando a técnica de ELISA.

[031]. Tabela 3. Nomeação e concentração proteica dos peptídeos sintéticos.

Peptídeo	Nome	Concentração (mg/mL)
Pep1	P.MI.LSR2.1	4,54
Pep2	P.MI.10Kdachap.1	1,65
Pep3	P.MI.18Kda.1	3,34
Pep4	P.MI.85B.1	4,09
Pep5	P.MI.85B.2	2,53

Padronização de teste imunoensaio (ELISA)

[032]. A reatividade dos peptídeos foi avaliada usando teste sorológico como ELISA indireto frente a um pool de soro de pacientes hansenianos e a outro de indivíduos saudáveis. Foram padronizadas as melhores condições para o teste variando os parâmetros de concentração de antígeno, concentração de solução de bloqueio, diluição de soro, diluição de conjugado e de Neutravidin®, como apresentado na Tabela 4.

[033]. Com o objetivo de avaliar os efeitos dos fatores experimentais e as interações entre as diversas variáveis no teste de ELISA, foi utilizado o desenho experimental (DoE, *design of experiments*) fatorial completo (2^5) V, tendo como variável resposta a relação entre a absorbância da amostra positiva e da amostra negativa.

[034]. De acordo com as análises a melhor condição obtida foi com antígeno na concentração de 150 ng/poço, bloqueio com BSA a 3% m/v, soro em diluição de 1:50, anticorpo secundário conjugado em diluição de 1:7500, e Neutravidin® em diluição de 1:7500.

[035]. Tabela 4. Variáveis avaliadas por delineamento experimental (variáveis independentes) para a padronização do teste ELISA.

Nível	Antígeno ng/poço	Bloqueio (% BSA)	Soro diluição	Anticorpo secundário diluição	Neutravidin® diluição
-1	30	3	1:100	1:7500	1:7500
0	75	4	1:200	1:10000	1:10000
1	120	5	1:300	1:12500	1:12500

[036]. As absorbâncias obtidas para os soros positivos variaram de 0,950 até 1,0364, enquanto que os soros negativos variaram de 0,072 até 0,106. A razão dos valores entre positivos e negativos variou de 10,19 a 18,94. A identificação de reatividade dos peptídeos na interação com IgG, resultou em valores de 10 até 18 vezes na relação dos valores positivos frente aos controles (Tabela 5).

[037]. Tabela 5. Avaliação dos peptídeos usando as condições ideais determinadas pelo desenho experimental fatorial completo V

Peptídeo	Positivo	Negativo	Diferença	Razão
Pep1	0,989	0,097	0,89	10,19
Pep2	1,100	0,106	0,99	10,38
Pep3	1,097	0,101	0,99	10,86
Pep4	1,364	0,072	1,29	18,94
Pep5	0,950	0,091	0,86	10,44

[038]. Os peptídeos foram avaliados por teste imunológico pela reação de ligação de antígeno/anticorpos específicos para pacientes com a doença diagnosticada como hanseníase multibacilar. Soros de 21 pacientes com diagnóstico clínico foram inseridos no experimento e 21 indivíduos saudáveis e não tendo contato com pacientes diagnosticado com hanseníase foram inseridos para calcular a sensibilidade, especificidade, exatidão do teste, Razão de verossimilhança negativa

(RVN), e Razão de verossimilhança positiva (RVP) (tabela 6). O peptídeo 5 não foi avaliado nesta etapa.

[039]. Tabela 6. Avaliação dos peptídeos frente ao painel de soros.

Pacientes Multibacilar	Pep1	Pep2	Pep3	Pep4
Sensibilidade (%)	87,50	85,71	85,71	95,24
Especificidade (%)	86,36	85,71	80,95	90,48
Exatidão (%)	80,95	85,71	83,33	92,86
RVP	0,08	0,17	0,18	0,06
RVN	9,72	6,00	4,49	9,50

[040]. Para a continuidade foi realizado o DoE, foi obtido o diagrama de Pareto (Figura 2) e analisada a interação das variáveis no teste ELISA. Os parâmetros estabelecidos para os diferentes fatores a serem usados no teste ELISA são planejados com experimento fatorial para o uso do peptídeo Pep4 em teste ELISA (Figura 2).

Amostras de soros para validação de teste ELISA com o antígeno P.MI.85B.1

[041]. Para validar o teste ELISA indireto foram utilizados soros de pacientes hansenianos multibacilares (MB) e paucibacilares (PB), contra soros de indivíduos saudáveis, e portadores de outras doenças. Foram usados soros de pacientes com tuberculose e leishmaniose por se tratarem de doenças causadas por organismos que infectam células do sistema fagocítico mononuclear. Também foram adicionados soros de indivíduos contactantes de pacientes hansenianos por morar na mesma residência (contatos). Para detalhes o número de soros por categoria está listado na Tabela 7.

[042]. Tabela 7. Amostras de soros utilizados em teste ELISA para avaliação dos peptídeos.

Quantidade	Amostra de soro
21	Positivo para hanseníase MB
24	Positivo para hanseníase PB
10	Contato com hanseníase
22	Positivo para tuberculose (TB)
8	Positivo para leishmaniose (LM)
15	Negativo (saudável)

Exemplo 3: Determinação de sensibilidade, especificidade e eficácia do método de diagnóstico sorológico por teste ELISA aplicando os antígenos peptídicos de *M. leprae*

[043]. Exemplo do desenho experimental, e determinação da sensibilidade e especificidade do teste são dados a seguir.

Delineamento experimental

[044]. Foi realizado o teste ELISA com avidex, utilizando ureia 6M, para avaliar a força das ligações, em relação ao teste sem avidex.

[045]. Para estimar sensibilidade e especificidade do teste para o Pep4, foram utilizadas as condições previamente determinadas para o teste ELISA. Os dados foram analisados no software MedCalc Version 18.2 usando o índice J de Youden, a sensibilidade e a especificidade, e a distribuição dos resultados é mostrada utilizando o programa GraphPad Prism version 8.0.0.

Determinação de sensibilidade e especificidade

[046]. No teste ELISA com avidéz foi obtida uma avidéz média de 39% para o Pep4, sendo que para MB foi de 48% e para PB foi de 31%, indicando uma força de ligação transiente.

[047]. Os resultados permitiram obter valores de sensibilidade de 80% quando fixada a especificidade a 95%, e de especificidade a 90% quando a sensibilidade é fixada a 87%, em teste com avidéz, como mostrado na Figura 2.

[048]. A curva Receiver Operator Characteristic Curves (Curvas ROC) das estimativas de sensibilidade e especificidade de reação do antígeno Pep4 com amostras de soro com hanseníase multibacilar (MB) e paucibacilar (PB) em teste ELISA sem avidéz (Figura 3.A) e com avidéz (Figura 3.B) são apresentadas na figura 3.

Avaliação da reação cruzada

[049]. A dispersão dos valores das absorbâncias dos soros positivos e negativos testados indicaram baixa probabilidade de falsos positivos e falsos negativos no teste ELISA, como observado na Figura 3. A resposta foi mais alta para positivos com a doença classificada em hanseníase paucibacilar (PB). No entanto, a resposta observada para os pacientes com a doença classificada em hanseníase multibacilar (MB) pode depender mais da resposta altamente variável do hospedeiro do que dos antígenos (Figura 4).

Descrição das Figuras

[050]. Figura 1 – Representa a modelagem in silico do peptídeo P.MI.85B.1 SEQ. ID. NO:1 localizando sua posição na proteína (cores em marron e azul) que o originou. A), P.MI.85B.1.

[051]. Figura 2 – O gráfico mostra os efeitos dos fatores principais (antígenos, solução de bloqueio, anticorpos e anticorpo secundário)

para o uso do peptídeo Pep4 em teste ensaio imuno-enzimático ELISA para diagnóstico da hanseníase.

[052]. Figura 3 - Receiver Operator Characteristic Curves (Curvas ROC) das estimativas de sensibilidade e especificidade de reação do antígeno Pep4 com amostras de soro com hanseníase multibacilar (MB) e paucibacilar (PB) em teste ELISA A) sem avaliação de avides, e B) com teste de avides, usando ureia.

[053]. Figura 4. Reatividade dos soros positivos e negativos frente ao peptídeo Pep4 (antígeno) com as condições estabelecidas para o teste ELISA.

[054]. Figura 5. A figura apresenta o peptídeo 4 testado em ELISA de avides para IgG a fim de selecionar se ele induzia anticorpos de alta avides. Em comparação com soros de portadores de outras doenças o Pep P.MI.85B.1 (SEQ. ID.1) apresentou alta avides (Figura 5) para pacientes paucibacilares e multibacilares, diferindo de doentes com TB, leishmaniose e indivíduos saudáveis.

REFERÊNCIAS

- Ministério da Saúde (Brasil) (2022a). Boletim Epidemiológico de Hanseníase. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – DCCI. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-hanseniase--25-01-2022.pdf> acessado 21/03/2023
- WHO (World Health Organization), 2021. Estratégia Global de Hanseníase 2021–2030: Rumo à zero hanseníase. Disponível em: <https://www.who.int/pt/publications/i/item/9789290228509>, acessado 21/03/2023.

- Ministério da Saúde (Brasil) (2022b). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase -PCDT. Brasília: Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde – SCTIE, Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde – DGITIS. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_terapeuticas_hanseniose.pdf, acessado 21/03/2023
- Mi Zihao, Liu Hong, Zhang Furen. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. *Frontiers in Immunology* 11 (2020). URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00567>
- Kou-Huang Chen, Cheng-Yao Lin, Shih-Bin Su, Kow-Tong Chen (2022) Leprosy: A Review of Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Management. *Journal of Tropical Medicine*, Article ID 8652062 <https://doi.org/10.1155/2022/8652062>
- Mayra B.C. Maymone, Melissa Laughter, Samantha Venkatesh, Mara M. Dacso, P. Narasimha Rao, Barbara M. Stryjewska, Jeremy Hugh, Robert P. Dellavalle, Cory A. Dunnick. 2020. Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. *Journal of the American Academy of Dermatology* 83, 1, 1-14. ISSN 0190-9622, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.12.080>.
- Alban, S.M., Sella, S.R., Miranda, R.N., Mira, M.T., & Soccol, V.T. (2009). PCR-restriction fragment length polymorphism analysis as a tool for *Mycobacterium* species identification in lepromas for lepromin production. *Leprosy review*, 80 2, 129-42 <https://doi.org/10.47276/lr.80.2.129>
- Alban, S.M., de Moura, J.F., Minozzo, J.C. et al. Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. *BMC Infect Dis* 13, 42 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-42>
- Alban SM, de Moura JF, Thomaz-Soccol V, Sékula SB, Alvarenga LM, Mira MT, et al. (2014) Phage Display and Synthetic Peptides as Promising

Biotechnological Tools for the Serological Diagnosis of Leprosy. PLoS ONE 9(8): e106222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106222>

Juliana F. de Santana, Mariângela R.B. da Silva, Guilherme F. Picheth, Isabel B. Yamanaka, Rafaela L. Fogaça, Vanete Thomaz-Soccol, Ricardo A. Machado-de-Avila, Carlos Chávez-Olórtegui, Maria Rita Sierakowski, Rilton Alves de Freitas, Larissa M. Alvarenga, Juliana de Moura. Engineered biomarkers for leprosy diagnosis using labeled and label-free analysis. *Talanta* 187, 165-171 (2018). ISSN 0039-9140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.027>

Bruno Araujo Soares, Kádima Nayara Teixeira, Juliana Ferreira de Santana, Bianca Luiza Melo de Assis, Cristiane Zocatelli-Ribeiro, João Paulo Stanke Scandelari, Vanete Thomaz-Soccol, Ricardo Andrez Machado-de-Ávila, Larissa Magalhães Alvarenga, Juliana de Moura. Epitope mapping from *Mycobacterium leprae* proteins: Convergent data from *in silico* and *in vitro* approaches for serodiagnosis of leprosy. *Molecular Immunology* 138, 48-57 (2021). ISSN 0161-5890. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.07.021>

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* Oct;126(1):131-8. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-x).

Hebditch Max, et al. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence, *Bioinformatics*, Volume 33, Issue 19, October 2017, Pages 3098–3100, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx345>

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press (2005). pp. 571-607

- J Yang, Y Zhang (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43: W174-W181.
- Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723. <http://www.expasy.org/spdbv/>
- Hambridge T, Nanjan Chandran SL, Geluk A, Saunderson P, Richardus JH. Mycobacterium leprae transmission characteristics during the declining stages of leprosy incidence: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 May 26;15(5):e0009436. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009436>
- Sayed, S.B., Nain, Z., Khan, M.S.A. et al. Exploring Lassa Virus Proteome to Design a Multi-epitope Vaccine Through Immunoinformatics and Immune Simulation Analyses. *Int J Pept Res Ther* 26, 2089–2107 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10989-019-10003-8>

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo sintético P.MI.85B.1 de *Mycobacterium leprae* caracterizado por consistir na Sequência ID N° 01.
2. Peptídeo sintético P.MI.85B.1 de *Mycobacterium leprae*, Sequência ID N° 01, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um antígeno para imunodiagnósticos *in vitro* da hanseníase pela detecção da presença de anticorpos circulantes ou outras moléculas ligantes.
3. Método de diagnóstico usando o peptídeo P.MI.85B.1, Sequência ID N° 01, de acordo com as reivindicações 1 e 2 caracterizado por compreender as etapas de:
 - a. colocar amostras de fluidos corporais, como soro, saliva, urina, sangue, plasma, do paciente que contenha anticorpos contra *M. leprae* em contato com antígeno P.MI.85B.1, Seq. ID N° 01;
 - b. detectar a reação entre componentes de *fluidos corporais* e o referido peptídeo P.MI.85B.1, Seq. ID N° 01, por métodos que possibilitem a detecção de anticorpos, imunocomplexos, proliferação celular e produção de citocinas.
4. Método de diagnóstico usando o peptídeo P.MI.85B.1, Seq. ID N° 01 de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4 caracterizado pela detecção ser feita por ensaios imunológicos, como por exemplo, testes imunoenzimáticos (ELISA, Western Blot, imunohistoquímica), testes por imunoaglutinação (exemplo fluxo lateral e outros), biosensores (sensores eletroquímicos, sensores ópticos por ressonância plasmônica de superfície, ou utilização de quantum dots, microscopia de força atômica, espectroscopia de fluorescência e outros) ou de qualquer outra forma de detecção relacionada direta ou indiretamente em amostras de fluidos corporais.

5. Métodos de imunodiagnóstico usando como antígeno o peptídeo P.MI.85B.1, SEQ ID N° 1, de acordo com a reivindicação 1 a 5, caracterizado por compreender a etapa de incubação com solução desnaturante, podendo ser esta uma solução de Ureia a 6 M.
6. Método para imunodiagnóstico de hanseníase de acordo com as reivindicações 4 a 6, caracterizado pela etapa (a) ser realizada mediante o uso do peptídeo P.MI.85B.1, SEQ ID N° 1, na faixa de concentração de 10 a 500 ng/poço e após incubação do antígeno o bloqueio ser realizado mediante o uso de solução de albumina bovina (BSA) variando de 1 a 5%;
7. Método para imunodiagnóstico de hanseníase de acordo com as reivindicações 4 a 6, caracterizado pela etapa (b) ser realizada mediante a diluição do fluído biológico em tampão de incubação (caseína em concentração entre 1,6 e 4,4% (m/v) em solução tampão fosfato-salina pH 7,4 na faixa de 1:50 a 1:400; e a etapa de diluição do anticorpo secundário de 1:1000 até 1:30000 em tampão de incubação.

DESENHOS

Figura 1

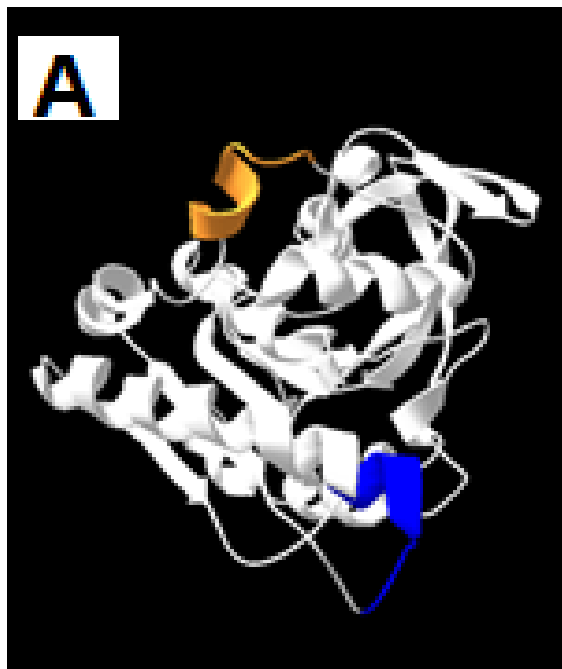
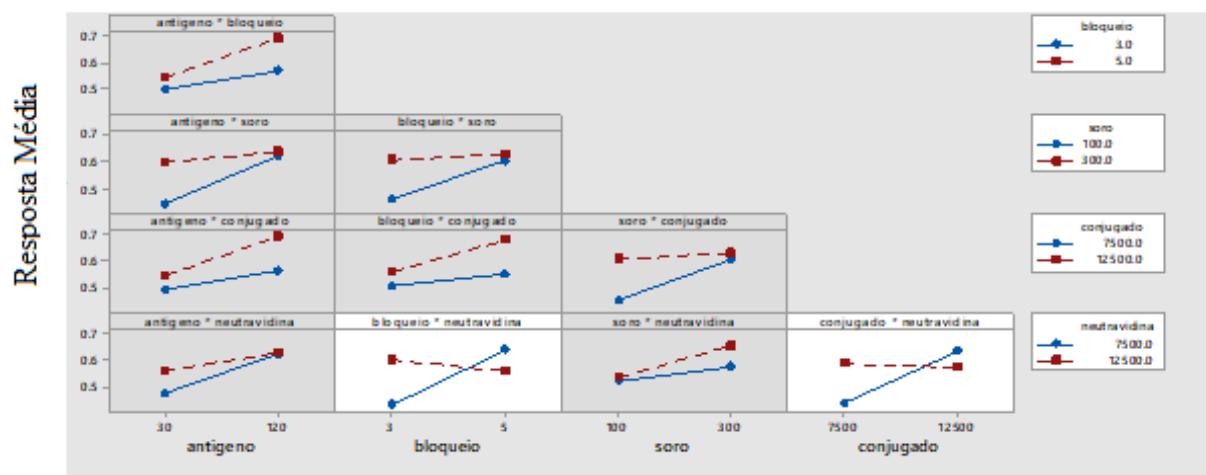
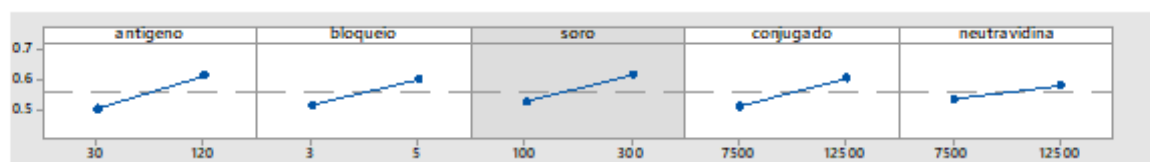


Figura 2



Gráficos de efeitos principais para resposta



Mostra como a alteração de um fator afeta a resposta

Figura 3

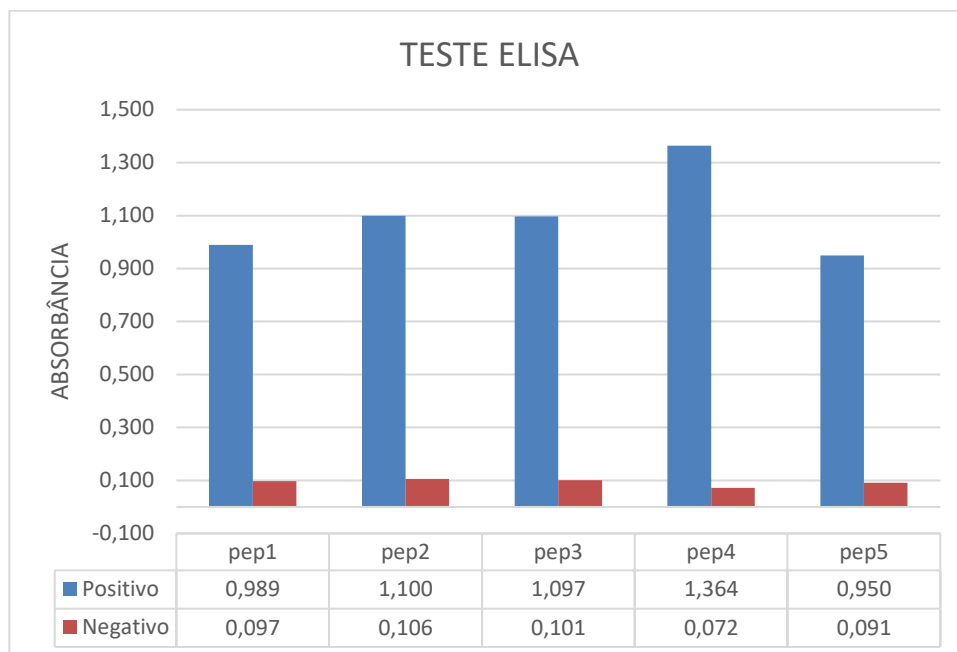
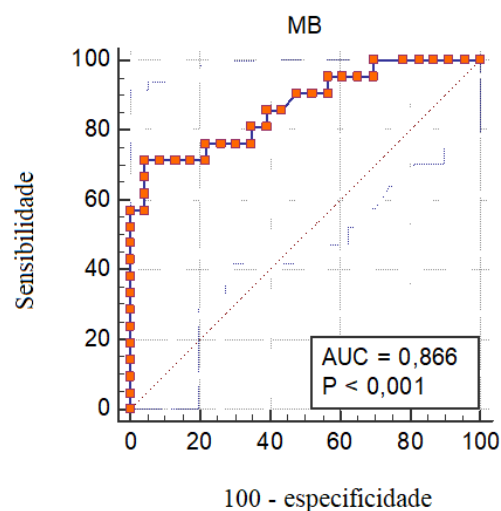


Figura 4

A – Pacientes Multibacilares

Estimada a sensibilidade com especificidade fixada			
Sensibilidade	Especificidade	95% CI ^a	Critério Abs
80	65,22	28,15 to 100,00	>0,388
90	52,61	21,74 to 95,65	>0,3058
95	43,48	17,39 to 73,91	>0,28285
97,5	30,43	4,35 to 52,17	>0,216575
99	30,43	4,35 to 52,17	>0,21563
Estimada e especificidade e fixada a sensibilidade			
Especificidade	Sensibilidade	95% CI ^a	Critério Abs
80	71,43	46,33 to 85,71	>0,4812
90	71,43	42,86 to 90,48	>0,5198
95	71,43	47,62 to 90,48	>0,5461
^a BC _a bootstrap intervalo de confiança (1000 interações;			
número aleatório: 978			

**B - Pacientes Paucibacilares**

Estimada a sensibilidade com especificidade fixada			
Sensibilidade	Especificidade	95% CI ^a	Critério Abs
80	63,64	22,76 to 95,45	>0,3312
90	45,45	9,09 to 72,73	>0,2901
95	45,45	9,09 to 72,73	>0,28605
97,5	45,45	9,09 to 72,73	>0,284025
Estimada e especificidade e fixada a sensibilidade			
Especificidade	Sensibilidade	95% CI ^a	Critério Abs
80	77,78	44,44 to 100,00	>0,4554
90	66,67	22,22 to 100,00	>0,5052
95	66,67	33,33 to 100,00	>0,5226
^a BC _a bootstrap intervalo de confiança (1000 interações;			
número aleatório: 978			

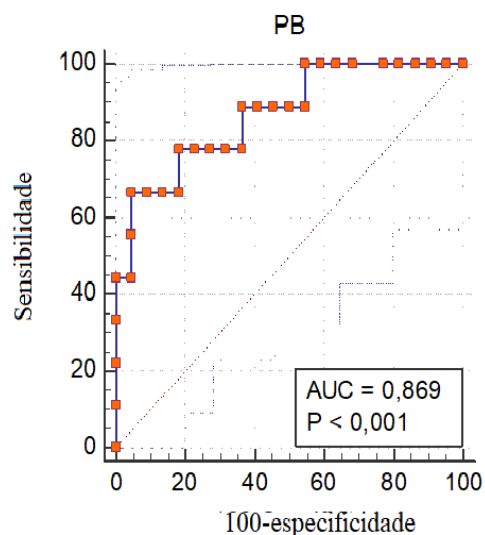


Figura 5

