

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE
PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade
Intelectual

Secretaria Internacional

(43) Data de Publicação Internacional
16 de Fevereiro de 2012 (16.02.2012)



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2012/019268 A2

(51) Classificação Internacional de Patentes :
A61K 39/008 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2011/000294

(22) Data do Depósito Internacional :
12 de Agosto de 2011 (12.08.2011)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
014100002830
13 de Agosto de 2010 (13.08.2010) BR
014110002431
9 de Agosto de 2011 (09.08.2011) BR

(71) Requerente (para todos os Estados designados, exceto
US) : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS - UFMG [BR/BR]; Avenida Antônio Carlos,
6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2013,
CEP: 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais (BR).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Requerentes (para US unicamente) :
TOSTES GAZZINELLI, Ricardo [BR/BR]; Rua
Espírito Santo, nº 1244 - apto 701, Bairro Lourdes, CEP:

30160-030 Belo Horizonte- MG (BR). MONTEIRO DE
ANDRADE, Héliida [BR/BR]; Rua Santa maria do
Itabira, Bairro Sion, CEP: 30310-600 Belo Horizonte,
MG (BR). MARIA SILVA COSTA FRANCO, Míriam
[BR/BR]; Rua Pará, Bairro dos Professores, CEP:
35170-013 Coronel Fabriciano, MG (BR). ROSA
FARIA, Angélica [BR/BR]; Rua Macedo, nº 89, Bairro
Floresta, CEP: 31015-370 Belo Horizonte, MG (BR).

(74) Mandatário : DE LUCA GUIMARÃES, Raissa;
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Avenida
Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º
andar, sala 2008, CEP: 31270-901 Belo Horizonte, Minas
Gerais (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para
todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG,
AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM,
KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(Continua na página seguinte)

(54) Title : AN IMMUNOGENIC COMPOSITION FOR USE IN A VACCINE AND AN IMMUNODIAGNOSTIC TEST KIT
FOR VISCERAL LEISHMANIASIS

(54) Título : COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA PARA VACINA E KIT PARA TESTE IMUNODIAGNÓSTICO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL

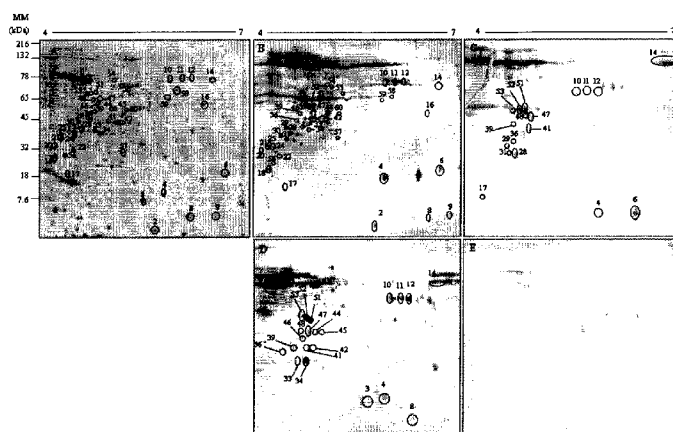


Figura 1

(57) Abstract : The present invention describes an immunogenic composition for use in a vaccine and a test for immunodiagnosis
of visceral leishmaniasis. More specifically, the invention comprises a vaccine and an immunodiagnostic test kit for leishmaniasis,
developed through the identification, production and selection of new antigens by means of proteomic analysis, bioinformatics,
peptide synthesis and immunoassay. The high specificity of these antigens makes it possible for an effective vaccine to be
developed against leishmaniasis, as well as a more efficient test for the immunodiagnosis of canine or human visceral
leishmaniasis.

(57) Resumo : A presente invenção descreve uma composição imunogênica para vacina e

(Continua na página seguinte)

WO 2012/019268 A2



(84) **Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— *sem relatório de pesquisa internacional; será republicado após receção do mesmo (Regra 48.2(g))*

teste imunodiagnóstico de Leishmaniose Visceral. Mais especificamente, a invenção compreende uma vacina e um kit para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, desenvolvidos através da identificação, produção e seleção de novos antígenos por meio de análise proteômica, bioinformática, síntese de peptídeos e imunoensaio. A alta especificidade desses antígenos possibilita a realização de uma vacina eficaz contra Leishmaniose e de um teste imunodiagnóstico mais eficiente para a Leishmaniose Visceral canina ou humana.

COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA PARA VACINA E KIT PARA TESTE IMUNODIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

A presente invenção descreve uma composição imunogênica para vacina e teste imunodiagnóstico de Leishmaniose Visceral. Mais especificamente, a invenção compreende uma vacina e um kit para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, desenvolvidos através da identificação, produção e seleção de novos antígenos por meio de análise proteômica, bioinformática, síntese de peptídeos e imunoensaio. A alta especificidade desses antígenos possibilita a realização de uma vacina eficaz contra Leishmaniose e de um teste imunodiagnóstico mais eficiente para a Leishmaniose Visceral canina ou humana.

As Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, ordem *Kinetoplastida* (Ross R 1903. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) Further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J* 2:1261-1401). Agrupam-se no gênero cerca de 30 espécies, sendo aceito que aproximadamente 21 tenham a capacidade de infectar humanos (Herwaldt B 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354 (9185): 1191-1199; Ashford R 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269–1281). A doença ocorre em 88 países com aproximadamente 12 milhões de infectados e 350 milhões de pessoas sob risco de contrair a infecção (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>).

Nos últimos 10 anos, regiões endêmicas têm se expandido e um considerável aumento no número de casos registrados da doença tem ocorrido em todo o mundo. Como a notificação da doença é compulsória em apenas 32 dos 88 países afetados pelas Leishmanioses, um grande número de casos não é contabilizado. De fato, considera-se que 2 milhões de novos casos (1,5 milhão para Leishmaniose Tegumentar e 500.000 para Leishmaniose Visceral) ocorram anualmente (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>).

Dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro, há várias manifestações clínicas da doença: Leishmaniose Cutânea, Mucocutânea, Difusa e Visceral. A Leishmaniose Visceral (LV), forma mais severa da doença, é uma antroponose na Índia e África Central e uma

zoonose na região do Mediterrâneo e nas Américas. A forma zoonótica da Leishmaniose Visceral (LV), causada por *L. infantum* (também denominada *L. chagasi*), representa 20% da leishmaniose visceral humana mundial (100.000 casos anualmente) e sua incidência é crescente nas áreas urbanas e peri-urbanas dos trópicos (Dye C 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* 55 (2):125–30).

O cão desempenha um papel importante dentro da epidemiologia da leishmaniose visceral zoonótica, já que este tem sido considerado como o principal reservatório doméstico para a doença humana (Ashford D, David J, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio M, Sampaio, Badaro R 1998. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 59 (1): 53-7; Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57:1-88). A importância dos cães como reservatório é decorrente do contato frequente e da proximidade com humanos, além do fato de o animal poder apresentar infecção assintomática, apesar da alta parasitemia na pele e nas vísceras (Madeira M, Schubach A, Schubach T, Leal C, Marzochi M 2004. Identification of *Leishmania chagasi* isolated from healthy skin symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis* 8:440-444).

O cão constitui um excelente modelo para estudo da LV. Esta espécie é alvo das medidas de controle e apresenta semelhança das alterações clínicas e anatomopatológicas com a LV humana. O modelo experimental canino pode ser utilizado para testes de drogas, identificação de moléculas marcadoras da infecção e ainda identificação de antígenos para uso diagnóstico, prognóstico e/ou vacinal em humanos. Em suma, o progresso do conhecimento da LV canina (LVC) pode ajudar a prevenir e tratar a doença humana (Moreno J, Alvar J 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18 (9): 399-05).

Nas áreas de ocorrência de LV, as medidas de controle incluem diagnóstico de caninos e humanos, para eliminação dos reservatórios e tratamento dos pacientes. Portanto, a precocidade do diagnóstico influencia no

sucesso do tratamento e no controle da transmissão. Entretanto, o diagnóstico canino enfrenta uma série de dificuldades tendo em vista os métodos disponíveis.

Atualmente, existe grande variedade de testes para diagnóstico da LVC.

5 Entretanto, cada um apresenta algum ponto negativo. A Reação de Fixação do Complemento e a Reação de Imunofluorescência Indireta, por exemplo, podem resultar em reações cruzadas com Doença de Chagas (DC) e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Já a reação de PCR tem uso limitado pelo alto custo e pouca adaptabilidade ao campo. O ensaio imunoenzimático (ELISA),
10 com os antígenos atualmente utilizados, também demonstra reações cruzadas.

Para o imunodiagnóstico de casos humanos, a disponibilidade de testes é pequena. No mercado brasileiro, praticamente a única opção para uso em humanos, com boa sensibilidade e especificidade, é a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta), que ainda não é ideal por apresentar
15 possibilidade de reações cruzadas devido ao uso de antígeno bruto. Além disso, é um teste que exige treinamento técnico apurado, uma vez que a interpretação do resultado é subjetiva nos casos de baixos títulos de anticorpos anti-Leishmania. A execução da RIFI é mais laboriosa do que outros métodos sorológicos, não havendo possibilidade de automação e sempre irá requerer a
20 aquisição de equipamento de alto custo (microscópio de imunofluorescência).

Considerando que a maioria dos métodos disponíveis possui desvantagens e que a ocorrência de reações cruzadas com outras infecções inviabiliza um diagnóstico correto, faz-se necessária a pesquisa de novos antígenos que permitam que a doença seja diagnosticada com maior
25 segurança, sensibilidade e especificidade, tanto em cães quanto em humanos. Entre os diferentes métodos para o diagnóstico, ELISA é o mais utilizado devido ao seu baixo custo e facilidade de execução.

Com o objetivo de melhorar os testes imunodiagnósticos disponíveis, algumas metodologias vêm sendo desenvolvidas, como as descritas nos
30 seguintes documentos de patentes: US 2010092938 - Novel and Practical Serological Assay for the Clinical Diagnosis of Leishmaniasis, US 2007134671 - Oligonucleotides for detection of leishmaniasis and methods thereof, US

5965142 - Polypeptides and methods for the detection of *L. tropica* infection, WO9633414 - Compounds and methods for diagnosis of leishmaniasis, US 5942403 - Compounds and methods for the detection of *t. cruzi* infection, PI9610679-4 – Antígenos de *Leishmania* para uso na terapia e diagnose da Leishmaniose, PI9300775-2 - Processo de diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina e/ou humana, WO 2005/063803 – Polypeptides for the diagnosis and therapy of leishmaniasis, WO 1996/033414 - Compounds and methods for diagnosis of leishmaniasis, WO 1989/001045 - *Leishmania*-specific antigens, process for preparing them, antigenic profiles containing these antigens and their application to the diagnosis of visceral leishmaniasis.

Estes documentos apresentam compostos que incluem polipeptídeos, contendo pelo menos uma parte imunogênica de pelo menos um antígeno de *Leishmania*, ou de uma variante deste, para serem usados em imunodiagnóstico de Leishmaniose. Porém, os polipeptídeos neles descritos, são diferentes dos utilizados na presente invenção e foram isolados por abordagens diferentes da utilizada na presente invenção. A presente invenção descreve a identificação, produção e seleção de novos antígenos por meio de análise proteômica, bioinformática, síntese de peptídeos e imunoensaio, permitindo a realização de um teste imunodiagnóstico mais específico e mais eficiente para a leishmaniose visceral canina ou humana.

Uma vez que a eficácia das medidas de controle da LV tem se mostrado inconsistente, a vacinação canina pode ser uma maneira efetiva de reduzir a transmissão (Gradoni L. 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 100 (1–2):87–103). Os diferentes imunógenos candidatos para o desenvolvimento de vacinas incluem parasitos mortos, frações purificadas, antígenos recombinantes de *Leishmania*, além de DNA codificante de antígeno (Melby PC. 2002. Vaccination against cutaneous leishmaniasis: current status. *Am J Clin Dermatol* 3(8):557–70). No modelo canino, diferentes estratégias de vacina contra LV têm sido utilizadas. A vacinação com promastigotas mortas ou misturas indefinidas de antígenos induzem resposta imune celular e proteção parcial contra a infecção (Gradoni, 2001). O ligante de fucose manose (FML)

purificado de *L. donovani* (Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante). Vaccine) e vários diferentes antígenos recombinantes, obtidos de proteínas purificadas, também conferem pelo menos proteção parcial contra infecção por *L. infantum* em cães (Saldarriaga OA, Travi BL, Park W, Perez LE, Melby PC. 2006. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs Vaccine 24: 1928–1940).

O desenvolvimento de vacinas contra este parasita é a principal meta da Organização Mundial de Saúde. Um grande número de estudos tem demonstrado que as diferentes formulações da vacina oferecem significativa proteção contra *Leishmania* em uma grande variedade de modelos animais (Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. 2006. Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology*.133: S87-112.; Drummelsmith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M. 2003. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol. Cell Proteomics* 2:146-55, de Oliveira CI, Nascimento IP, Barral A, Soto M, Barral-Netto M. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. *Parasitol. Int.* 2009, 19). Atualmente, somente quatro vacinas estão licenciadas para uso: uma utilizada para humanos no Uzbesquistão, outra utilizada como imunoterapia no Brasil e duas vacinas para cães de uso profilático também no Brasil (Palatnik-de-Sousa CB. *Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years*. 2008. Vaccine.26(14):1709-24; Fernandes AP, Costa MMS, Coelho EA, Michalick MS, de Freitas E, Melo MN, Luiz Tafuri W, Resende Dde M, Hermont V, Abrantes Cde F, Gazzinelli RT. 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. Vaccine 26: 5888-5895).

Entretanto, a eficácia das vacinas permanece parcial, e, portanto é necessário o desenvolvimento de vacinas de grande eficácia. O desenvolvimento de vacinas para *Leishmania* é um grande desafio devido ao

insuficiente conhecimento da patogenicidade e da complexidade da resposta imunológica necessária para proteção. Além disso, um pequeno número de antígenos de *Leishmania* tem sido testado como vacina, sugerindo que há ainda muitos antígenos potenciais para serem avaliados (Matlashewski, G. Leishmania infection and virulence. 2001. Microbiol Immunol. 190: 37-42 El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. 2002. Proteomics.2: 1007-1117; Dea-Ayuela MA, Rama-Iñiguez S, Bolás-Fernández F. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. 2006. Proteomics.6:4187-4194; Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. 2007 Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat. Rev. Microbiol.5: 873-882; de Oliveira CI, Nascimento IP, Barral A, Soto M, Barral-Netto M. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. *Parasitol. Int.* 2009, 19; Herrera-Najera C, Piña-Aguilar R, Xacur-Garcia F, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E. 2009 Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates. Proteomics. 9:1293-301).

Estudos proteômicos com *Leishmania* demonstraram a diferença de expressão protéica entre amastigotas e promastigotas e a possibilidade de utilização da “sorologia proteômica” como uma abordagem adequada para mapeamento da antigenicidade na leishmaniose. Recentemente, um estudo utilizando 2-DE de extrato de promastigotas de *L. infantum*, seguido de Western Blot com soro de coelhos imunizados e análise por EM, permitiu a identificação de várias proteínas antigênicas relevantes (Dea-Ayuela M, Rama-Iñiguez S, Bolás-Fernández F 2006. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics* 6: 4187-4194). Numa abordagem semelhante, foram identificados vários antígenos de *L. donovani* utilizando soros e parasitos isolados de pacientes indianos, permitindo concluir que a abordagem proteoma-sorologia produz uma compreensiva e altamente resolvida representação da antigenicidade de *L. donovani* e da especificidade da resposta imune anti-leishmania em pacientes com LV (Forgber M, Basu R, Roychoudhury K, Theinert S, Roy S, Sundar S, Walden P 2006. Mapping the

antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. *PLoS ONE* 1:e40). Todos esses estudos utilizaram amastigotas de cultura axênica. A presente invenção demonstra a utilização do extrato protéico de promastigotas para identificação de antígenos que participarão da
5 composição imunogênica para vacina contra Leishmaniose.

Vários documentos de patentes que demonstram o uso de polipeptídeos de *Leishmania* em composição imunogênica para vacina foram encontrados no estado da técnica. Como exemplo, citam-se os seguintes: WO 2009143006 - Recombinant polyprotein vaccines for the treatment and diagnosis of
10 leishmaniasis, WO 2007121184 - Compounds and methods for diagnosis and treatment of leishmaniasis, WO 2006110915 - Vaccine formulations for leishmania, US 2006073170 - Vaccine complex for preventing or treating leishmaniasis, CA 2503932 - Polypeptides of leishmania major and polynucleotides encoding same and vaccinal, therapeutical and diagnostic
15 applications thereof, WO 02098359 - Leishmania antigens for use in the therapy and diagnosis of leishmaniasis. Nenhum deles, porém, utiliza as mesmas proteínas e/ou peptídeos demonstrados na presente invenção, além de não demonstrarem o isolamento destes por análise proteômica. A presente invenção descreve a identificação, produção e seleção de novos antígenos por
20 meio de análise proteômica, bioinformática e imunoensaio, permitindo a produção de uma vacina mais específica e mais eficiente para a leishmaniose visceral canina ou humana.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 - Extratos protéicos de formas promastigotas de *L. chagasi* foram
25 fracionados por 2-DE usando tiras de 18 cm, pH 4-7 e SDS-PAGE a 12%. Os géis foram corados com coomassie (A) ou transferidos para membranas de nitrocelulose (B, C e D) e incubados com soros de cães naturalmente infectados ou não infectados (E) e revelados com anti-IgG total (B e E) anti-IgG1 (C) anti-IgG2 (D) conjugado com peroxidase. Os “spots” reconhecidos
30 somente por animais infectados e identificados por EM (Espectrometria de Massa) estão destacados.

Figura 2 – Para avaliar a reatividade de anticorpos aos peptídeos sintetizados nas membranas, foi calculada a intensidade relativa (IR) entre soros infectados e não infectados para o mesmo peptídeo. Foram considerados reativos os peptídeos com IR>2,0. As proteínas e as seqüências dos peptídeos estão mostrados na Tabela 2.

Figura 3 - Para avaliar a reatividade de anticorpos aos peptídeos sintetizados nas membranas, foi calculada a intensidade relativa (IR) entre soros infectados e não infectados para o mesmo peptídeo. Foram considerados reativos, peptídeos com IR>2,0. As proteínas e as sequências dos peptídeos estão mostrados na Tabela 3.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

Obtenção das Proteínas

Promastigotas de *Leishmania chagasi* (MCAN/BR/2000/BH400) foram cultivadas a 23°C em meio Schneider (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma), 200U de penicilina (Sigma), 100µg de estreptomicina (Sigma). Essas formas foram utilizadas na fase exponencial de crescimento para extração de proteínas.

Para obtenção das proteínas os parasitas foram lavados 3 vezes no meio Schneider (Gibco BRL) com centrifugação a 200g por 5 minutos a 4°C. O sedimento celular foi homogeneizado em um tampão de lise (8M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS, 65 mM ditiotretitol - DTT, 40 mM Tris-base e coquetel de inibidor de protease da GE Healhtcere) na proporção de 500 µL de tampão de lise para 10⁹ parasitas. As amostras foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e centrifugadas a 20.000g por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante (extrato protéico) foi mantido a -70°C. A proteína foi quantificada por 2D-Quant kit (GE Healthcare, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Eletroforese Bidimensional (2-DE)

Foi empregado o protocolo descrito anteriormente (Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, Ricart CA. 2004. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics* 4(4):1052-9.), com

modificações. Utilizou-se 500 µg de proteína em volume final de 350µL por fita em tampão IEF (8M uréia, 2M tiouréia, 4%CHAPS, 10mMDTT, traço de azul de bromofenol) e 1% de anfólitos. Para a focalização isoelétrica (IEF), após a reidratação, as fitas, de 18cm pH 4-7, contendo as amostras foram submetidas a IEF a 20°C, 50 µA/gel com as seguintes condições: 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h e 8.0000 V por 5 h. Antes da segunda dimensão, as fitas IPGs foram submetidas à redução e alquilação por incubação consecutiva, por 15 minutos, em 5 mL de DTT 125 mM e, em seguida Iodacetamida 125 mM, em tampão de equilíbrio (50mM Tris-HCl pH 8,8, 6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e 0.002% bromofenol blue). Para separação na segunda dimensão foi realizada eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 12% usando o sistema Ettan DALT 6 unit (GE Healthcare) conectado a um sistema de resfriamento.

“Western blot”

“Western blot” de proteínas de promastigotas foi realizado a partir do gel da eletroforese bidimensional (2-DE) descrita anteriormente. As proteínas do gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) utilizando o Semidry Transfer Unit (GE Healthcare) e incubadas com uma solução de bloqueio (5% de leite desnatado Molico em 20mM Tris, 500mM NaCl, pH 7,4) a 4°C por 16 a 18h. As membranas, em seguida, foram incubadas com soro de cães naturalmente infectados em fase crônica e, também, com soros de fase aguda, após 30 dias de infecção experimental, além de soros de cães não infectados por *L. chagasi*. O anticorpo primário foi utilizado em diluição 1:500 em solução de bloqueio, por 2 horas, à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com 0.05% PBS–Tween por 15 minutos, as membranas foram incubadas com anti-IgG total ou anti-IgM conjugados com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:10.000. Para revelação da reação foi utilizada a mistura de duas soluções: 6 mg of 3,3'-diaminobenzidina DAB (D-5637, Sigma) em 12 mL do tampão PBS e 12mL da solução contendo 10mL de PBS, 2mL de metanol e 10 µL de peróxido de hidrogênio (Towbin H, Gordon J. 1984. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. J Immunol Methods. 4;72(2):313-40). Os experimentos foram realizados em

triplicata. Para cada grupo de membrana, também foi confeccionado um gel que não foi transferido, mas corado por coomassie coloidal- CBB G-250 (Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9(6):255-62.).

Géis corados e membranas provenientes do WB (**Figura 1**) foram digitalizados e a imagem analisada por programa de computador para serem normalizados e para identificar a posição das proteínas no gel reveladas no WB, utilizando como referência os marcadores de ponto isoelétrico (pI) e de massa molecular (MM).

As imagens das membranas foram analisadas para seleção dos “spots” que são reconhecidos por soros de animais infectados, descartando-se aqueles que são reconhecidas por soros de animais não infectados (reações inespecíficas). Os “spots” selecionados como imunogênicos e sem reações inespecíficas nas fases aguda e crônica da infecção canina foram retirados dos géis para identificação por espectrometria de massa (EM = MS).

Digestão das Proteínas

Os “spots” selecionados foram retirados do gel manualmente. Cada “spot” foi colocado em um tubo de 1,5mL e lavado três vezes em 100µL de bicarbonato de amônio a 25mM e 50% v/v de acetonitrila. Após secagem, os fragmentos do gel foram reidratados com 10µL de tripsina (Promega), a 20 ng/µL em 25mM de bicarbonato de amônio por 30 minutos a 4°C. O excesso da solução foi retirado e os pedaços de géis foram lavados com 10 µL da mesma solução sem adição de tripsina e deixados a 37°C por 16h. Os peptídeos extraídos foram lavados duas vezes, por 15 minutos, com 30µL de 50% acetonitrila/5% ácido fórmico. Em seguida, o material digerido por tripsina foi concentrado em SpeedVac (Savant) a um volume de aproximadamente 10µL e dessalinizados pela Zip-Tip® (C18 resina; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA). Os peptídeos foram eluídos da coluna em 50% acetonitrila/5% ácido fórmico e congelados a -20°C até o momento do uso.

Espectrometria de Massa - MALDI-TOF-TOF

As amostras foram misturadas à matriz [10mg/mL de R-ciano-4-ácido hidroxicinâmico (Aldrich, Milwaukee, WI) em acetonitrila 50%/ácido trifluoracético 0,1%] e aplicadas na placa para análise no equipamento 4700 proteomics analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Ambos MS e MS/MS foram adquiridos com o laser neodmium-doped yttrium aluminum garnet (Nd:YAG) com 200-Hz. Os espectros foram editados usando os programas FlexAnalysis e Biotoools.

Os "spots" foram identificados através de busca em banco de dados, realizada através do programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) e usando o banco de dados do National Center for Biotechnology (NCBI). Os parâmetros de busca foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 100-200ppm, carbamidometilação, máximo de um sítio triptico de corte não clivado e oxidação da metionina. Esse ensaio permitiu identificar 45 proteínas candidatas para uso em diagnóstico da LVC, inclusive na fase aguda da infecção. A **Tabela 1** mostra apenas 10, destas 45 proteínas, que foram utilizadas na composição imunogênica para vacina e kit para teste imunodiagnóstico de leishmaniose visceral.

Tabela 1 – Proteínas de formas promastigotas de *L. chagasi* reconhecidas por soros caninos em WB com gel 2-DE e identificadas por espectrometria de massa (MS/MS), selecionadas para vacina e kit para teste imunodiagnóstico de leishmaniose visceral.

NOME DA PROTEÍNA (<i>L. infantum</i>)	GI (Identificador)	SEQ ID No
Proteína hipotética conservada	gi 68127339	54
Proteína hipotética conservada	gi 134072971	55
Proteína hipotética, conservada	gi 68124247	56
Proteína hipotética,	gi 70799658	57

conservada		
Proteína hipotética, conservada	gi 134060528	58
Proteína hipotética, conservada	gi 134070112	59
Proteína hipotética	gi 146094146	60
Elongase de ácido graxo, putative	gi 68125282	61
Peroxidoxina 1	gi 11761380	62
Proteína do choque térmico 83-1	gi 146097493	63

Predição de epitopos

As seqüências de aminoácidos das 45 proteínas identificadas foram processadas usando duas abordagens distintas:

1) A localização de epitopos lineares de células B através de predição pelos softwares “BCPreds” (disponível em <http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/>) e “ABCPred” (disponível em <http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), a partir de similaridade e alinhamento de seqüências, utilizando modelos matemáticos (Yang X, Yu X 2009. An introduction to epitope prediction methods and software. *Rev Med Virol* 19:77-96). Após mapeamento *in silico*, os epitopos gerados por ambos os softwares foram comparados, para selecionar aqueles resultantes da sobreposição de predições dos dois softwares simultaneamente. Além disso, foi estabelecido que o tamanho desses peptídeos deveria estar entre 9 e 15 aminoácidos.

2) A localização de epitopos lineares de células B através de predição pelo Programa BEPIPRED, através de uma combinação de modelos matemáticos (Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Jens Erik Pontoppidan Larsen, Ole Lund and Morten Nielsen. *Immunome Research* 2:2, 2006). Após o mapeamento *in silico*, os peptídeos com “score” maior que 2,0, foram selecionados para síntese.

Dessa forma, foram selecionados 180 peptídeos resultantes da sobreposição dos programas de predição “BCPreds” e “ABCPred” (dado não mostrado) e coincidentemente também 180 diferentes peptídeos resultantes da análise pelo programa BEIPRED (dado não mostrado).

5 As sequências identificadas no mapeamento indicam quais os peptídeos de cada proteína têm maior probabilidade de interagir com anticorpos. Deve ser ressaltado que diferentes peptídeos foram selecionados de uma mesma proteína. Estes foram sintetizados em duplicata, pelo método de “Spot” síntese descrito a seguir, e testados com “pool” de soros de cães infectados e não
10 infectados por *L. chagasi*.

Mapeamento de células T

Todas as proteínas identificadas na presente invenção, tanto as selecionadas por expressão, quanto as selecionadas por “western blot”, foram mapeadas utilizando o programa NetCTL (www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL),
15 um serviço da Web para a predição de epítomos de células T citolítica em seqüências de proteína – (Larsen, M.V.; Lundegaard, C.; Lamberth, K.; Buus, S.; Brunak, S.; Lund, O.; Nielsen, M. 2005 An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. Eur. J. Immunol
20 35:2295-2303).

O programa NetCTL foi escolhido para a predição de epítomos de linfócitos T citotóxicos por integrar as previsões para diferentes passos envolvidos na apresentação de antígenos às moléculas de MHC classe I: clivagem proteossomal, eficiência de transporte pelo TAP e afinidade ao MHC
25 I. Mais importante, o método NetCTL mostrou ter um melhor desempenho preditivo que outros programas como SYFPEITHI, BIMAS, EpiJen, MAPPP, MHC way, e métodos WAPP usando um conjunto de dados contendo cerca de 300 epítomos 300 CTL validados experimentalmente (Larsen, M.V.; Lundegaard, C.; Lamberth, K.; Buus, S.; Lund, O.; Nielsen, M. 2007 Large-
30 scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. BMC Bioinformatics 8:424). Vários estudos também têm utilizado este método para

previsões epítipo CTL que foram experimentalmente validados (Lv, H.; Gao, Y.; Wu, Y.; Zhai, M.; Li, L.; Zhu, Y.; Liu, W.; Wu, Z.; Chen, F.; Qi, Y. 2010 Identification of a novel cytotoxic T lymphocyte epitope from CFP21, a secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Lett* 30 (133):94-98; Singh, S.P.; Mishra, B.N. 2009 Identification and characterization of merozoite surface protein 1 epitope. *Bioinformation* 17, 1-5; Larsen, M.V.; Lelic, A.; Parsons, R.; Nielsen, M.; Hoof, I.; Lamberth, K.; Loeb, M.B.; Buus, S.; Bramson, J.; Lund, O. Identification of CD8+ T cell epitopes in the West Nile virus polyprotein by reverse-immunology using NetCTL. *PLoS One*. 2010, 5:e12697; Wang, M.; Larsen, M.V.; Nielsen, M.; Harndahl, M.; Justesen, S.; Dziegiel, M.H.; Buus, S.; Tang, S.T.; Lund, O.; Claesson, M.H. HLA Class I Binding 9mer Peptides from Influenza A Virus Induce CD4+ T Cell responses *PLoS One*. 2010, 5:e10533; Pérez, C.L.; Larsen, M.V.; Gustafsson, R.; Norström, M.M.; Atlas, A.; Nixon, D.F.; Nielsen, M.; Lund, O.; Karlsson, A.C. 2008 Broadly immunogenic HLA class I supertype-restricted elite CTL epitopes recognized in a diverse population infected with different HIV-1 subtypes. *Immunol* 180(7):5092-100; Tang, S.T.; Wang, M.; Lamberth, K.; Harndahl, M.; Dziegiel, M.H.; Claesson, M.H.; Buus, S.; Lund, O. 2008 MHC-I-restricted epitopes conserved among variola and other related orthopoxviruses are recognized by T cells 30 years after vaccination. *Arch Virol* 153:1833-44).

Na presente análise, foram selecionados epítopos com escore maior que 0,75, o que corresponde a um bom compromisso entre a sensibilidade (0,8) e especificidade (0,97).

Testou-se, também a capacidade de cada peptídeo/proteína se ligar a 10 supertipos diferentes de HLA (A1, B58 A2, A3, A24, B7, B8, B27, B44, B62) por meio de análise virtual. A análise indicou que a maior proporção de nanômetros foi encontrada com capacidade de ligar ao alelo A24 (17,54%), seguido dos alelos A3 (14,86%) e B62 (11,90%) e, depois os demais. A maioria dos nanômetros foi prevista a ligar a um único HLA, mas alguns pareceram ser promíscuos e se ligam a vários supertipos. O maior número de supertipos ao qual um peptídeo pode vincular foi de cinco. Em média, cerca de 78% dos peptídeos preditos foram encontrados como capazes de ligar a apenas um

supertipo, 16,6% dos peptídeos reagiram a dois HLA, 4,3% dos peptídeos se ligam a três HLA, 1,1% se ligam a quatro HLA, e 0,06% dos peptídeos se ligam a cinco supertipos.

- Então, considerando o que foi descrito, foram selecionados como promissores candidatos à vacina as proteínas que possuem alto percentual de epitopos para células T, bem como os peptídeos “mais promíscuos”, ou seja com capacidade de se ligar à maior diversidade de supertipos de HLA (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Proteínas selecionadas por NetCTL para uso em vacina.

Spot Code	SEQ ID N°	Proteína	% de peptídeos	N° de peptídeos com score >1.5
73	61	Fatty acid elongase, putative gi 68125282	33.0	16
53	64	Heat shock protein 83; HSP 90 Gi 123669	29.5	16
74	65	Sterol 24-c-methyltransferase Gi 146104460	29.3	22
32	55	Tryparedoxin peroxidase gi 134072971	29.3	11
75	62	Peroxidoxin 1 gi 11761380	29.1	10
65	66	Hypothetical protein Gi 146091091	28.6	9
2	67	Hypothetical protein Gi 146105064	27.6	17
24	68	14-3-3 protein-like protein Gi 146104107	27.6	12
30	69	IgE-dependent histamine- releasing factor Gi 146088052	27.2	9
4	70	Prostaglandin f2-alpha synthase Gi 146095209	26.0	6
49	63	Heat shock protein 83-1 gi 146097493	26.3	23

Tabela 3. Sequência de peptídeos selecionados por NetCTL para uso em vacina.

Spot Code	SEQ ID N°	Proteína	Sequência do peptídeo	N° de supertipos
18	71	Putative eukaryotic initiation factor 4a	223-FMRDPVRIL-231	5
47	58, 21, 22, 23	Hypothetical protein	486-WSSQSPKSF-494	5
64	56, 37, 38, 39, 40, 41, 42	Hypothetical protein	1326-RMMGVLFDY-1334	5
72	72	Aldose 1-epimerase	84-FTLDGVKYY-92	5
3M	73	Mannose-1-phosphate guanylttransferase	75-WSRKLGVSF-83	5
1	74	Alpha tubulin	164-KSKLGYTVY-172	4
3	75	Phosphomannomutase	539-GTEPKIKWY-547	4
9	76	70 kDa heat shock protein	83-ITNPQSTFY-91	4
10	77	Actin	162-HTVPIYEGY-170	4
23	78	Hypothetical protein	184-GLYDGRYVF-192	4
34	79	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	48-KTGKLLGSY-56	4
36	80	Hypothetical protein	276-LTCCSLLSY-284	4
39	81	Adenosine kinase	168-FTLTIDVNY-176	4
40	82	Putative ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	128-QSGQFRLGY-136	4
44	83	S-adenosylhomocysteine hydrolase	59-VLIETLKAL-67	4
51	84	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	224-WVMPAYAYL-232	4
52	85	Hypothetical protein	131-WLQQAVRYF-139	4

55	86	Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	1-MRRFASRAL-9	4
----	----	--	---------------	---

Síntese de Peptídeos em membrana de celulose: método de Spot síntese

Os aminoácidos são depositados em volume mínimo (0,6 µL) com auxílio de um micropipetador automático, permitindo obter aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto. A síntese múltipla é realizada em sintetizador (Abimed Spot Synthesis–ASP222) e o plano de distribuição dos aminoácidos, bem como a determinação dos protocolos dos diversos peptídeos são definidos em programa de computação Multipeps (Molina F, Laune D, Gougat C, Pau B, Granier C 1996. Improved performances of Spot multiple peptide synthesis. *Pept Res* 9:151-155).

Os grupamentos hidroxilas livres sobre a membrana de celulose são utilizados como pontos de ancoragem para a síntese do peptídeo. Esses grupamentos são conjugados através de ligação estável com 8 a 10 unidades de polietilenoglicol (PEG), objetivando afastar o peptídeo do suporte e conferir maior estabilidade na ligação do peptídeo à membrana.

A síntese do peptídeo inicia-se pelo C-terminal do último aminoácido da sequência determinada. Com a desproteção do grupo ligado ao 9-fluorenilmetiloxycarbonila protetor (Fmoc), pela adição de piperidina (20% em dimetilformamida - DMF), as funções aminas são recuperadas e podem ser visualizadas pela coloração azul com bromofenol.

Os aminoácidos são, em seguida, ativados por diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBT) (150 µL para cada aminoácido) e depositados para reinício de outro ciclo, sendo que os ativadores propiciam um rendimento de ligação variando de 74 a 87% por ciclo. A reposição de aminoácidos sempre começa com a arginina, por ser o aminoácido mais lábil, e cada aminoácido é depositado duas vezes por ciclo. As reações de ligação são monitoradas por mudança de coloração dos “spots”, passando da cor azul ao verde-amarelado.

As funções NH₂ livres, ou que não reagiram, são acetiladas (anidrido acético 10% em DMF) para evitar a formação de peptídeos irregulares ou

outras ligações indesejáveis. O grupo protetor Fmoc do próximo aminoácido é novamente clivado, em meio básico pela piperidina, verificando a ligação pela coloração com bromofenol. Efetuam-se lavagens da membrana com metanol e secagem da mesma ao ar fresco. Em seguida, a membrana é realocada no sintetizador para outro ciclo.

Pelo método de “Spot” síntese, o tamanho do peptídeo construído é limitado a aproximadamente 15 aminoácidos (Laune L, Molina F, Ferrières G, Villard S, Bès C, Rieunier F, Chardes T, Granier C 2002. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J Immunol Method* 267:53-70), pois persistem dúvidas quanto à qualidade da ligação de peptídeos muito alongados ou grandes. Ao final da síntese, os grupos laterais inicialmente protegidos dos aminoácidos são desprotegidos pela adição de ácido trifluoracético (TFA) associado a diclorometano e trietilsilano. Finalmente, os peptídeos encontram-se fixados de maneira covalente à membrana.

A membrana construída contendo os diversos peptídeos pode ser analisada por imunoenaios de colorimetria. A capacidade dos peptídeos sintéticos de se ligarem com anticorpos é avaliada por ensaios imunológicos e estes podem ser reproduzidos várias vezes utilizando-se a mesma membrana, após regeneração da mesma (Frank R 1992. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48:9217-9232).

Imunoensaio

Para os ensaios sorológicos foram utilizados soros de cães com infecção por *L. chagasi* nas fases aguda e crônica, soros de animais livres dessa parasitose e ainda soros de cães portadores de *Trypanosoma cruzi*.

Os soros de cães em fase aguda da infecção por *L. chagasi* foram provenientes de animais com infecção experimental e foram coletados até 60 dias após a inoculação. Os soros de animais com LV, *T. cruzi* (fase crônica) e de cães saudáveis foram obtidos a partir de soroteca.

Imunoensaio com peptídeos ligados à membrana

As membranas contendo os peptídeos sintéticos foram incubadas por aproximadamente 16 a 18 horas com solução de bloqueio (PBS pH 7,4, Tween-20 a 0,2%, sacarose a 4% e BSA a 5%) em temperatura ambiente. Após bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas com os soros testes por 120 min a temperatura ambiente. Após novas lavagens, o conjugado (anticorpos anti-IgG total, anti-IgG1, anti-IgG2 ou anti-IgM caninos conjugados com fosfatase alcalina) foi adicionado e mantido sob agitação por 120 minutos. Após três lavagens com PBS contendo Tween-20 a 0,2% e outras três subseqüentes com PBS sob agitação à temperatura ambiente, foi adicionado o substrato para fosfatase alcalina (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina) e o cromógeno (cloreto de nitroblue tetrazólio) BCIP/ NBT, Promega.

A reação, interrompida após três lavagens da membrana com água destilada, pode ser visualizada pela presença de um precipitado azulado sobre os peptídeos ("spots") mais reativos (Frank, 1992).

A intensidade da cor foi calculada utilizando o software Image Master Platinum® (GE), comparando o perfil de reconhecimento de uma membrana incubada com "pool" de soros de cães não infectados, perante outra membrana, contendo os mesmos peptídeos, incubada com "pool" de soros de cães infectados. Desse modo, foi possível comparar a intensidade da cor, obtendo assim a razão entre soros infectados e não infectados. Definiu-se que apenas os "spots" com razão igual ou superior a 2 são considerados válidos. Esses "spots" foram produzidos novamente em "Spot" síntese para avaliação com soros individuais, tanto positivos quanto negativos.

Ao final dos ensaios imunológicos, as membranas foram documentadas e, em seguida, submetidas a um tratamento de regeneração, para sua reutilização. As membranas foram tratadas com DMF, reagente A (uréia 8M, 1% de SDS) e reagente B (ácido acético/etanol/água na proporção 60:30:10) para remover os complexos moleculares precipitados sobre os peptídeos.

A presente invenção pode ser melhor compreendida, de forma não limitante, através dos exemplos que se seguem:

EXEMPLO 1: SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS RECONHECIDOS ESPECIFICAMENTE ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO DE SOROS POSITIVOS COM OS NEGATIVOS PARA LV

Após imunoensaio das membranas contendo os peptídeos sintetizados, foi realizada uma análise da intensidade relativa dos peptídeos, calculada pela razão entre a intensidade da cor da reação com soros positivos e negativos utilizando o programa de computador (Platinum 7.0). Dessa maneira, foi possível selecionar os peptídeos reconhecidos especificamente através da comparação de soros positivos com os negativos para LV (**Tabelas 4 e 5**).

Os 24 peptídeos descritos na **Tabela 4** não apresentaram reação inespecífica (com soros não infectados) e nem reação cruzada com soro de cães infectados com *T.cruzi*. Esses peptídeos são correspondentes a 16 proteínas diferentes. A intensidade relativa dos peptídeos selecionados está demonstrada na **Figura 2**.

Tabela 4: Proteínas mapeadas para epitopos B e peptídeos sintetizados utilizando sobreposição dos programas de predição "BCPreds" e "ABCPred". São mostrados apenas os peptídeos selecionados após imunoensaio.

PROTEÍNAS	GI	PEPTÍDEOS SELECIONADOS	SEQ ID No
Beta-tubulina	13569565	<u>NNIKSSICDIPPKG</u>	5
Elongase de ácido graxo, putative	68125282	<u>WNNNIFYDGPVGAF</u> <u>FTNRRCDSNATNAR</u>	6 7
Fator 1-beta de elongação	146104117	<u>KAKDAEKKKAKTD</u>	8
Peroxidoxina 1	11761380	<u>TVNDMPVGRNV</u>	9
Polipeptídeo nascente associado a complexo homólogo, cadeia alfa	8671200	<u>SKRYAKAMAKMGLK</u>	10
Proteína do choque térmico 83- 1	146097493	<u>ASDACDKIRYQSLT</u> <u>RKNIVKKCLEMFDE</u>	11 12

Proteína do choque térmico 83	123669	<u>KDVTKEEYAAFYKA</u>	13
		<u>NDWEDPMATKHFSV</u>	14
Proteína hipotética	146094146	<u>NGDRYDGEWKDDKR</u>	16
		<u>EGEWQDGKMHGKGT</u>	17
		<u>QGDRYTGEWYQGKK</u>	18
Proteína hipotética	146088184	<u>TGNSWDKVSSVVGQ</u>	19
Proteína hipotética conservada e Proteína hipotética	134070112 e 146088184	<u>KLDITGKPMV</u>	20
Proteína hipotética, conservada	134060528	<u>QRELKMVVAQS</u>	23
Proteína hipotética, conservada	70799658	<u>GSAASPPPSGTRT</u>	35
		<u>SQQLLGQRLYGLWK</u>	36
Proteína hipotética, conservada	68124247	<u>TMESSKSHEK</u>	43
		<u>FRAISTPRTGTMP</u>	44
		<u>AAAPVVFAAKT</u>	45
Proteína hipotética e Proteína hipotética conservada	146099283 e 134072971	<u>NGEDGKTRNDT</u>	50
Subunidade do fator 3 de iniciação em eucariotos	146103712	<u>GQVEGRTYDAAMVA</u>	52
		<u>IQVYRSDVPVN</u>	53

Desse mesmo modo, outros 29 peptídeos (que reconheceram soro de cães infectados com *L. chagasi*, mas não soros de animais controle e nem infectados com *T. cruzi*) foram selecionados e estão descritos na **Tabela 5**. Esses peptídeos correspondem a 15 proteínas diferentes. A intensidade

5 relativa dos peptídeos selecionados está demonstrada na **Figura 3**.

Tabela 5: Proteínas mapeadas para epítomos B e peptídeos sintetizados por apresentarem “score” maior que 2,0 utilizando o programa de predição “BEIPRED”. São mostrados apenas os peptídeos selecionados após imunoensaio.

PROTEÍNAS	GI	PEPTÍDEOS SELECCIONADOS	SEQ ID No
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	146095259	<u>FQSQPPPGVPQG</u>	1
		<u>RHQDTNAAPAGS</u>	2
Aldose 1-epimerase	72547339	<u>GYPKNPEEAYAD</u>	3
		<u>LPASGGPGQRYA</u>	4
Heat shock protein 83-1	146097493	<u>VTKEYEVQNK</u>	15
Hypothetical protein, conserved	134060528	<u>TRGVKSSSKLPA</u>	21
		<u>RDDPHKVTPSDM</u>	22
Hypothetical protein, conserved	70799658	<u>PHRAGETSAAGL</u>	24
		<u>SQQAPAVPPLPQ</u>	25
		<u>TEKSPSSPQPRV</u>	26
		<u>QGMMSPGRSEEEK</u>	27
		<u>VPKGDKAVSSPP</u>	28
		<u>GERRRGDAEDGR</u>	29
		<u>SSAGAAGARCST</u>	30
		<u>PSAQQQQQPTNA</u>	31
		<u>QQQQQPTNAGCT</u>	32
		<u>SSRPSPPSKVSS</u>	33
Hypothetical protein, conserved	68124247	<u>AAAAASSPSIAP</u>	34
		<u>ANIKGVPTRAET</u>	37
		<u>DSDDTEEGEDEG</u>	38

		<u>EGTAGEPKPPAM</u>	39
		<u>MRTSTDMP SQHI</u>	40
		<u>TRQTSQEPTVVS</u>	41
		<u>PLATQSYGFGSD</u>	42
Hypothetical protein, conserved	68124249	<u>GVAPPGWYDPPVQ</u>	46
Hypothetical protein, conserved	68127339	<u>TERPEGANFATP</u>	47
		<u>LTMNTNQPRMPQ</u>	48
Hypothetical protein, conserved	68127339	<u>VEGERVETT</u>	49
Ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	146081834	<u>EAPSKQDKPVEN</u>	51

Esses resultados foram resumidos na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Levantamento numérico das proteínas e peptídeos investigados até a seleção

<i>Moléculas estudadas</i>	<i>Número</i>
Proteínas mapeadas	45
Peptídeos sintetizados	360
Peptídeos com alta especificidade	53

Em síntese, foram selecionados 53 peptídeos sintéticos com potencial para diagnóstico sensível e específico da leishmaniose visceral. Dentre esses 53 peptídeos, 35 pertencem a 9 diferentes proteínas hipotéticas, o que significa que são bastante promissores para novos testes diagnósticos, uma vez que essas proteínas hipotéticas ainda não haviam sido exploradas quanto a esse potencial.

[illegible]

Foi possível observar que o perfil de reconhecimento de peptídeos foi variável entre os diferentes soros. Entretanto, houve alguns peptídeos que

foram reconhecidos pela maior parte dos soros testados. A maioria dos peptídeos testados foram reconhecidos por pelo menos um soro individual (Tabela 7).

De acordo com a análise dos resultados, foram selecionados como os melhores peptídeos aqueles que reconheceram o maior número de soros individuais, e que também não tiveram reação cruzada com *T. cruzi*. Dessa forma, os peptídeos 1, 3, 5, 7, 13, 14, 15, 16, 22 e 23 foram selecionados para serem sintetizados de forma solúvel em maiores quantidades, para permitir sua utilização como antígenos em ensaios de ELISA.

A técnica foi padronizada para determinar a melhor diluição dos soros caninos, do conjugado utilizado e também a concentração dos peptídeos sintéticos que iriam sensibilizar as placas. Os resultados obtidos com a triagem utilizando soros caninos foram comparados com aqueles obtidos utilizando o kit EIE_LVC produzido por Bio-Manguinhos, utilizado pelo Ministério da Saúde.

Tabela 8: Avaliação do desempenho de ELISA com diferentes peptídeos sintéticos, usando 62 amostras positivas e 20 negativas

PEPTÍDEO	S (%)	E (%)	AUC	SINT (n=23) + %	ASSINT (n=39) + %	TOTAL + %
1	72,50	75,00	0,754	17 (73,9%)	28 (71,7%)	45 (72,5%)
3	75,80	70,00	0,769	16 (69,5%)	31 (79,4%)	47 (75,8%)
5	74,10	70,00	0,778	22 (95,6%)	24 (61,5%)	46 (74,1%)
7	75,80	70,00	0,797	11 (47,8%)	36 (92,3%)	47 (75,8%)
14	70,96	55,00	0,642	16 (69,5%)	28 (71,7%)	44 (70,96%)
13	79,00	85,00	0,904	16 (69,5%)	33 (84,6%)	49 (79,0%)
15	85,40	80,00	0,863	19 (82,6%)	34 (87,1%)	53 (85,4%)
16	82,26	95,00	0,944	17 (73,9%)	34 (87,1%)	51 (82,2%)
22	79,00	75,00	0,847	12 (52,1%)	37 (94,8%)	49 (79,0%)
23	88,70	85,00	0,947	20 (86,9%)	35 (89,7%)	55 (88,7%)
Mistura de todos os peptídeos	75,81	95,00	0,916	13 (56,5%)	34 (87,1%)	47 (75,8%)

S= sensibilidade, E= especificidade, AUC= área sob a curva ROC, sint= sintomáticos, assint= assintomáticos

A sensibilidade dos testes empregando peptídeos sintéticos variou, de acordo com o peptídeo utilizado, de 70,96 a 88,7% (**Tabela 8**), enquanto o teste produzido por Bio-Manguinhos teve sensibilidade variando de 8,0 a 15,5%. A especificidade observada, no entanto, foi de 55,0 a 95,0%, para os novos antígenos e de 97,8 a 100% para o teste de Bio-Manguinhos. Dentre os cães assintomáticos, de 61,5 a 94,8% deles foram detectados pelos testes utilizando diferentes peptídeos sintéticos, enquanto nenhum foi detectado pelo teste EIE-LVC. Esses resultados foram observados quando se testou um total de 62 amostras de soros caninos sabidamente positivos, e 20 sabidamente negativos.

Com os resultados observados na **Tabela 8**, foi possível selecionar os peptídeos que apresentaram melhores resultados (maior acurácia do teste - AUC), para desse forma testar esses peptídeos com um número maior de amostras. Portanto, os peptídeos 13, 16, 23 e a mistura de todos eles foram testados com um painel de 107 amostras sorológicas. O resultado pode ser observado pela **Tabela 9**, em que é possível ver a grande acurácia desses testes (valores próximos ao máximo 1,0). Além disso, a sensibilidade apresentada é consideravelmente maior do que aquela obtida com o kit EIE-LVC, preconizado pelo Ministério da Saúde.

Tabela 9: Avaliação do desempenho de ELISA com diferentes peptídeos sintéticos, usando 107 amostras positivas e 20 negativas

Peptídeo	Sensibilidade	Especificidade	AUC	YOU DEN INDEX J
13	71,03	55,0)	0,661	0,260
16	81,3	70,0	0,876	0,513
23	84,1	80,0	0,888	0,641
Mistura de todos os peptídeos	78,5	80,0	0,902	0,585
EIE-LVC Kit	13,08	100,0	-	0,130

Isso torna o ELISA utilizando peptídeos sintéticos, uma técnica de grande potencial no diagnóstico canino.

EXEMPLO 3: AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS MAIS PROMISSORAS PARA USO EM VACINA

Para avaliar, dentre as proteínas identificadas, quais seriam as mais promissoras para uso em vacina, todas foram mapeadas utilizando o programa NetCTL (www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL). Esse programa é um algoritmo combinado para fazer predição de ligação a HLA classe I, clivagem pelo proteassoma e eficiência de transporte pelo TAP (transporter associated with antigen processing) simultaneamente nas seqüências de aminoácidos de uma dada proteína (Peters, B., Bulik S., Tampe, R., Endert, P.M.V. and Holzthutter, H.G. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. J. Immunol. 2003, 171, 1741-1749.). Também foi avaliada a capacidade de cada proteína ligar a 10 diferentes supertipos de HLA (A1, A2, A3, A24, B7, B8, B27, B44, B58 e B62) por bioinformática. Dessa forma, foram selecionadas para serem utilizadas como antígenos em composições vacinais as proteínas que apresentam maior percentual de epitopos para HLA I e/ou maior capacidade de se ligarem a diferentes supertipos de HLA (**Tabela 10**).

Tabela 10 – Proteínas que, segundo mapeamento pelo programa NetCTL, apresentam maior percentual de epitopos para HLA I.

PROTEÍNAS	SEQ ID N°	PERCENTUAL DE EPITOPOS PARA HLA I	NÚMERO DE SUPERTIPOS DE HLA
GI - 68124247	56	24.9	5
GI - 70799658	57	17.2	4
GI - 134060528	58	<15.0	5
GI - 134070112	59	23.7	2
GI - 146094146	60	24.3	4
GI - 68125282	61	33.0	4
GI - 11761380	62	29.1	4
GI - 146097493	63	26.3	2

REIVINDICAÇÕES

- 1- **COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**, caracterizada por compreender pelo menos uma proteína e/ou peptídeo selecionado de um grupo representado pelas Seq ID N° 1 a 86.
- 5 2- **COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por gerar resposta imune celular e/ou humoral.
- 3- **KIT PARA TESTE IMUNODIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**, caracterizado por compreender pelo menos uma das
10 proteínas ou peptídeos representados pelas Seq ID N° 1 a 63, ligados a um suporte.
- 4- **KIT PARA TESTE IMUNODIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo suporte
15 ser preferencialmente uma placa de microtitulação para ELISA ou uma membrana.
- 5- **KIT PARA TESTE IMUNODIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**, de acordo com as reivindicações 2 e 3, caracterizado por utilizar técnicas de imunodiagnóstico selecionadas do grupo compreendendo ELISA, "Western blot", "Dot blot" e Imunocromatografia.
- 20 6- **VACINA CONTRA LEISHMANIOSE**, caracterizada por compreender pelo menos uma das proteínas representadas pelas Seq ID N° 56 a 86, ou parte destas, em combinação com pelo menos um adjuvante.
- 7- **VACINA CONTRA LEISHMANIOSE**, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo adjuvante ser selecionado de um grupo que
25 compreende oligonucleotídeos cotendo CpG, agonistas de TLR, saponinas, AGPs ou uma combinação destes.
- 8- **VACINA CONTRA LEISHMANIOSE**, de acordo com as reivindicações 6 e 7, caracterizada por ser administrada em quantidade suficiente para induzir resposta imune protetora em mamífero.
- 30 9- **VACINA CONTRA LEISHMANIOSE**, de acordo com as reivindicações 6 a 8, caracterizada por ser administrada pelas vias intramuscular, subcutânea, oral ou parenteral.

10- VACINA CONTRA LEISHMANIOSE, de acordo com as reivindicações 6 a 9, caracterizada por ser para imunização, profilaxia ou tratamento de mamíferos com risco de contrair ou que sofrem de Leishmaniose.

FIGURAS

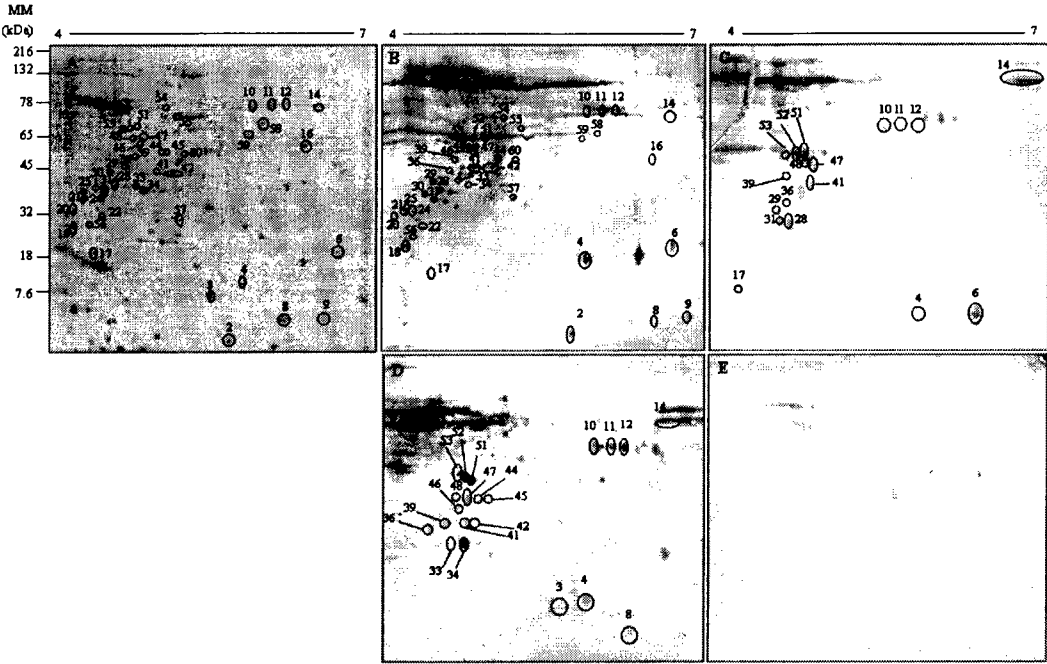


Figura 1

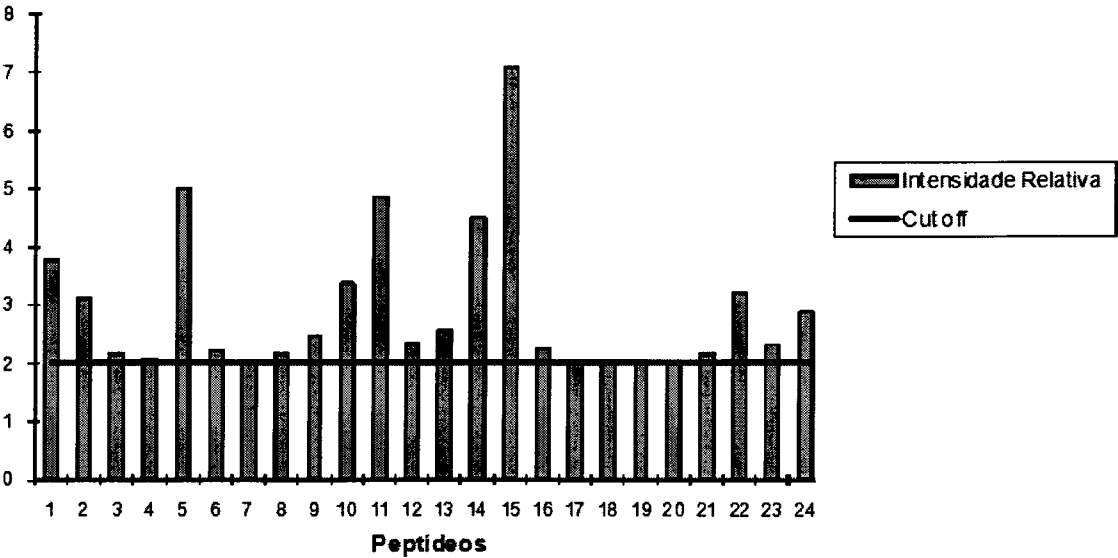


Figura 2

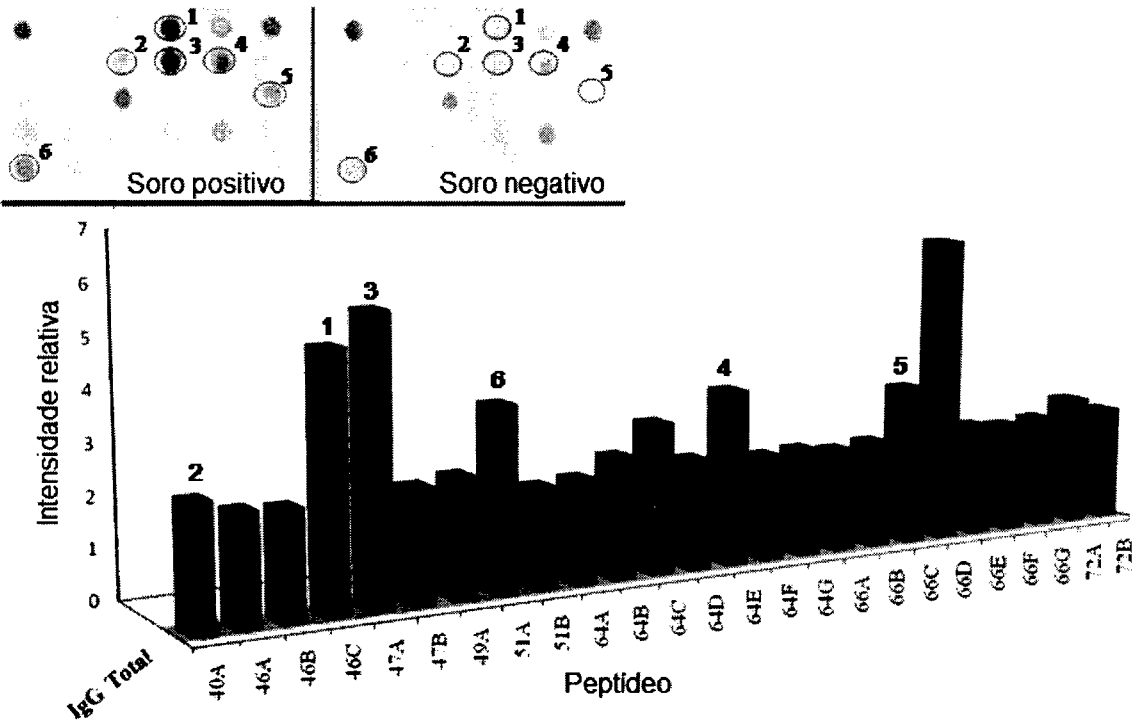


Figura 3