

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2013.05.15</b>	(73) Titular(es): <b>STAB VIDA, INVESTIGAÇÃO E SERVIÇOS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, LDA.</b>	
(30) Prioridade(s):	<b>MADAN PARQUE, RUA DOS INVENTORES, S/N, SALA 2.18 2825-182 CAPARICA</b>	<b>PT</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2014.11.17</b>	<b>BCA, BORRELIOSE CENTRUM AUGSBURG</b>	<b>DE</b>
(45) Data e BPI da concessão: /	<b>BETRIEBS GMBH &amp; CO KG</b>	<b>ES</b>
	<b>MICROLIQUID SL</b>	<b>IT</b>
	<b>MICRO BIO DEVICES S.R.L</b>	<b>IT</b>
	(72) Inventor(es):	
	<b>ALCINO ORFÉU DE LEÃO E FLORES</b>	<b>PT</b>
	<b>FRANCISCO DE BORJA BARREDO</b>	<b>ES</b>
	<b>GIOVANNI UGO ALTIERI</b>	<b>IT</b>
	<b>ARMIN JOSEF SHWARZBACH</b>	<b>DE</b>
	(74) Mandatário:	
	<b>ANA MARIA DA SILVA EUGÉNIO</b>	
	<b>CCA Advogados - Rua Vítor Cordon 10A - 4º piso 1249-202 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **BIOCHIP (1) E BOUQUET DE 16 ANTIGÉNIOS (2) PARA A DETECÇÃO DA DOENÇA DE LYME AGUDA E CRÓNICA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONA-SE COM UM ENSAIO IMUNO-DETETÁVEL, SEMELHANTE A UM ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA), PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA BORRELIA BURGDORFERI F.L. (BACTÉRIA RESPONSÁVEL PELOS SINTOMAS DA DOENÇA DE LYME), NUMA AMOSTRA RECOLHIDA DE UM PACIENTE. O ENSAIO DESTA INVENÇÃO É MAIS ESPECÍFICO, MAIS SENSÍVEL E MAIS PRECISO QUE AS TÉCNICAS ELISA CONHECIDAS, PERMITINDO UMA MELHOR IDENTIFICAÇÃO DOS REFERIDOS ANTICORPOS ORIGINADOS NA REACÇÃO IMUNOLÓGICA DO ORGANISMO INFETADO, DEVIDO AOS 16 ANTIGÉNIOS SELECIONADOS E QUE PODEM TAMBÉM SER FIXADOS NUM BIOCHIP.A PRESENÇA DE ANTICORPOS CONTRA BORRELIA BURGDORFERI F.L. CAPTURADOS NO BIOCHIP, TAMBÉM PODE SER DETETADA COM QUANTUM DOTS, QUE RECONHECERÃO O COMPLEXO ANTIGÉNIO-ANTICORPO E PERMITIRÃO A OBSERVAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA NO BIOCHIP.A PRESENTE INVENÇÃO É ÚTIL NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE LYME AGUDA E CRÓNICA, COM A VANTAGEM DE SE REVELAR UM MÉTODO RÁPIDO, SIMPLES, ESPECÍFICO, PRECISO E DE BAIXO CUSTO, PODENDO SER APLICADA NA ÁREA CLÍNICA.

## Resumo

### "Biochip (1) e bouquet de 16 antigénios (2) para a deteção da doença de Lyme aguda e crónica"

A presente invenção relaciona-se com um ensaio imuno-detetável, semelhante a um Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), para a deteção de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* f.l. (bactéria responsável pelos sintomas da doença de Lyme), numa amostra recolhida de um paciente. O ensaio desta invenção é mais específico, mais sensível e mais preciso que as técnicas ELISA conhecidas, permitindo uma melhor identificação dos referidos anticorpos originados na reação imunológica do organismo infetado, devido aos 16 antigénios selecionados e que podem também ser fixados num Biochip.

A presença de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* f.l. capturados no Biochip, também pode ser detetada com Quantum Dots, que reconhecerão o complexo antigénio-anticorpo e permitirão a observação de fluorescência no Biochip.

A presente invenção é útil no diagnóstico da doença de Lyme aguda e crónica, com a vantagem de se revelar um método rápido, simples, específico, preciso e de baixo custo, podendo ser aplicada na área clínica.

## Descrição

### "Biochip e bouquet de 16 antigénios para a deteção da doença de Lyme aguda e crónica"

#### 1 - Doença de Lyme, uma doença endémica

A doença de Lyme é uma doença endémica, provocada pela bactéria *Borrelia burgdorferi f.l.*, que afeta 63 países à volta do mundo, incluindo os 27 estados membros da União Europeia. O Escritório Regional para a Europa da Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que atualmente surgem 85,000 novos casos de doença de Lyme na Europa (avaliando dados nacionais), porém teme-se que este número seja largamente maior, uma vez que na Europa os casos reportados são altamente inconsistentes e muitas infeções por parte desta doença não são diagnosticadas corretamente.

O número de casos reportados de doença de Lyme aumentou desde os inícios dos anos 90, e a distribuição geográfica expandiu-se devido às alterações do clima (Lindgren, E. and Jaenson, Thomas G.T., 2006). No ano de 1993, estimou-se que esta doença tinha um custo de 660 milhões de euros para a sociedade, sendo o custo por paciente de cerca de 40,750€ (Irwin T. Vanderhoof, PhD, CLU et al., 1993). Desde então o número de casos mais do que duplicou, o que fez com que o custo para a sociedade aumentasse para mais de mil milhões de euros.

Os primeiros sintomas da doença de Lyme incluem febre, dor de cabeça, fadiga, depressão e por uma erupção cutânea característica denominada por "*erythema migrans*". Quando detetada a tempo, a infeção e os sintomas podem ser eliminados recorrendo-se a antibióticos. Porém, se esta doença não for tratada, os sintomas podem afetar o sistema nervoso central, o coração e as articulações, o que se torna muito difícil de tratar.

Ocasionalmente, os sintomas como a artrite persistem após a infecção ter sido eliminada, o que sugere que a *Borrelia burgdorferi* f.l. pode promover infecções crônicas e infecção-induzida autoimune (Steer et. al, 2004).

## **2 - *Borrelia burgdorferi* f.l., bactéria causadora da doença de Lyme**

A *Borrelia burgdorferi* f.l. é uma bactéria pleomórfica com um ciclo de vida complexo que engloba uma multitude de formas, incluindo a forma de saca-rolhas (denominada parental, pois é a forma que esta bactéria possui quando infeta o hospedeiro), a forma de cistos (sem parede celular), entre outras formas.

Embora conhecidas há mais de um século, as bactérias com parede celular deficiente (CWDB), onde se inclui a *Borrelia*, só foram ligadas clinicamente a doenças relevantes durante as últimas décadas. A falta de parede neste tipo de bactérias faz com que estas sejam muito difíceis de detetar segundo os métodos usuais de deteção, tais como o microscópio de luz e teste serológicos padrão, isto porque este tipo de bactérias desencadeia uma resposta imunológica diferente do normal. Como resultado, as CWDB provocam infecções difíceis de diagnosticar e tratar, permanecendo no corpo durante um longo período de tempo e causando doenças crônicas.

A existência de variantes pleomórficas da espiroqueta de *Borrelia* explica potencialmente, a habilidade que esta bactéria possui para permanecer no hospedeiro como adormecida, durante prolongados períodos de latência clínica assintomática. De acordo com os sintomas e duração da doença, existem 3 fases da doença de Lyme:

- 1 - Infecção localizada da pele ("erythema migrans");

2 - Infecção caracterizada pela inflamação de diferentes órgãos, semanas ou até meses após a transmissão da *Borrelia*;

3 - Infecção persistente, com inflamação crônica de diferentes órgãos e sistemas por mais de 1 ano.

A bactéria *Borrelia burgdorferi* f.l. foi implicada em manifestações clínicas mais severas, tais como a borreliosis neocortical (neuroborreliosis), a qual tem sido associada à doença de Alzheimer.

### 3 - Métodos de diagnóstico da doença de Lyme

Os sintomas comuns provocados pela doença de Lyme são sintomas semelhantes a uma gripe, dores de cabeça, dores nas articulações, problemas gastrointestinais, sensibilidade à luz/som e um mal-estar geral, porém a variedade de sintomas difere de paciente para paciente: alguns pacientes apenas apresentam infecções na pele enquanto outros apenas desenvolvem sintomas tardios, como a artrite.

Como apenas 60% dos pacientes desenvolvem características de "erythema migrans" e cerca de 25-30% dos pacientes se lembra de ter sido picado, os restantes 10-15% dos pacientes só são confirmados por testes laboratoriais. Os sintomas da fase tardia desta doença são consequência, em parte, da falta de sensibilidade e eficiência das ferramentas de diagnóstico que são capazes de detetar a doença nas suas primeiras fases, quando esta é facilmente tratada.

O Centro de Controlo de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América propõe um critério de diagnóstico em dois níveis, para o diagnóstico serológico da doença de Lyme:

- Um primeiro nível onde se realiza um ensaio imunológico positivo (ELISA), seguido de um segundo nível onde se realiza um *Western Blot* (WB) para confirmar os

resultados do ensaio imunológico (ELISA). Ambos os ensaios possuem falta de sensibilidade e a interpretação do WB varia de laboratório para laboratório.

Esta estratégia falha o diagnóstico da primeira fase da doença em 80% dos casos (Wilske, Bettina (2005)), e não distingue entre infecção aguda ou crónica.

Os mesmos problemas de sensibilidade são encontrados na avaliação do fluido cerebrospinal (CSF), onde os teste serológicos apenas detetam 10-30% dos pacientes com *neuroborreliosis*.

Até à data, não existe nenhuma ferramenta de diagnóstico capaz de detetar com sensibilidade e especificidade a resposta imunológica desencadeada pelas formas *Borrelia burgdorferi f.l.* de parede celular deficiente, as quais são responsáveis pelos sintomas crónicos severos de *borreliosis*. Estas formas apresentam um padrão de expressão proteico alterado, assim como diferenças nos antígenos comparados com a forma "parental". Como resultado, estas formas não são detetadas com os correntes métodos comerciais baseados nos antígenos contidos nos lisados celulares totais da forma "parental" da *Borrelia burgdorferi f.l.*.

#### **4 - Métodos de diagnóstico da doença de Lyme desenhado pela STAB VIDA.**

Nos últimos anos foram descritos, em artigos científicos e médicos, novos péptidos e proteínas antigénicas para a deteção de infeções por *Borrelia burgdorferi f.l.*, que na primeira fase da doença quer em fases mais avançadas. Além disso, o uso de proteínas recombinantes e antígenos sintéticos (tais como o antígeno Arp e o antígeno DbpA) mostrou resultados melhores e mais precisos em teste serológicos do que em extratos bacterianos inteiros. A última pesquisa nesta área

aponta para uma combinação de antígenos num único ensaio, como sendo a melhor maneira de combater os problemas dos testes atuais. Porém, um ensaio que integre esta combinação ainda não se encontra no mercado.

Baseando-nos nas necessidades do mercado, dois principais requisitos são claramente identificáveis:

- 1-Melhoramento da técnica de WB, a qual exige um trabalho laboratorial intensivo, consome muito tempo e é difícil de padronizar. Sendo assim, a nova ferramenta deveria ser robusta, fácil de usar e permitir interpretações inequívocas dos resultados dos testes.
- 2-Evitar a necessidade de dois testes, para tornar o diagnóstico seguro, e permitir que as infecções crônicas sejam detetadas, incluindo os novos antígenos que foram reportados na literatura nos últimos anos, mas que ainda não alcançaram o uso clínico.

Com estas premissas em mente, um consórcio das PME APPLIED RESEARCH USING OMIC SCIENCES SL (AROMICS), B-C-A BORRELIOSE CENTRUM AUGSBURG BETRIEBS GMBH & CO KG (BCA), microLIQUID sl (MLD), STAB VIDA, INVESTIGACAO E SERVICOS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS LDA. (STAB VIDA), MICRO BIO DEVICES S.R.L (MICRO BIO), JYVASKYLAN YLIOPISTO (JYU), SERVILOG SA (WOW), desenvolveu uma ferramenta robusta, específica e de alta sensibilidade. Esta ferramenta consiste num Biochip, onde estão incorporados 16 antígenos específicos (IgG, IgM, *E. coli* lysate, OspC, C2, C6, OspE1/2, OspA, DbpA, LFA1, Arp, *Babesia microti*, péptidos *Ehrlichia*, espiroqueta *Borrelia burgdorferi* B31, cisto *Borrelia burgdorferi* B31, *Borrelia garinii*, *Borrelia azfелиi*) para os anticorpos da doença Lyme. Este Biochip depois de carregado com amostras de soro do paciente, e após alguns procedimentos é colocado num Leitor de quimio-luminescência, que irá dar o diagnóstico do paciente. O mesmo grupo de antígenos pode ser utilizado

como um teste de ELISA, inovador pela composição e carácter inventivo de pelo menos 2 dos 16 antigénios.

#### **5 - Como interpretar os resultados fornecidos pelo Leitor de quimio-luminescência**

O Biochip, como já foi referido, está carregado com 16 antigénios específicos para os anticorpos da doença de Lyme. A amostra de soro do organismo supostamente infetado é recolhida e carregada numa das câmaras do Biochip, aguarda-se alguns minutos para que a amostra entre no Biochip. De seguida, remove-se o excesso de amostra e carrega-se a câmara com uma mistura de reagentes e tampões químicos, processo que se repete duas vezes. Após este procedimento, o Biochip é inserido no Leitor de quimio-luminescência (inventado pelos autores desta patente), que possui um software fácil de utilizar.

Os anticorpos de segunda ligação, que reconhecem os anticorpos IgG e IgM aprisionados pelos antigénios estão ligados a *Quantum Dots* e quando um anticorpo da amostra se liga a um antigénio fica-se, com uma ligação anticorpo-antigénio-anticorpo secundário-*Quantum Dots*. Assim, se esta ligação se verificar no Biochip, o Leitor de quimio-luminescência irá excitar estes *Quantum Dots* que por sua vez transmitirão fluorescência, lendo-se este sinal como um resultado positivo da presença de infeção na amostra.

Ou seja, se for transmitida fluorescência significa que houve a ligação anticorpo-antigénio, logo chega-se à conclusão que o paciente está infetado com a bactéria *Borrelia burgdorferi f.l.* e desenvolveu sintomas de doença de Lyme. Se não for transmitida fluorescência significa que a ligação anticorpo-antigénio não ocorreu, logo o paciente não desenvolveu a doença de Lyme.



## Descrição detalhada da invenção

### 1. Bouquet de 16 antigénios

Foi concebido um conjunto inovador de antigénios, a que chamamos um novo bouquet de 16 antigénios, específicos no todo ou em parte para a deteção da doença de Lyme, sendo eles os seguintes:

- IgG e IgM, ambos utilizados como controlo positivo da reação imunológica;
- Lisados celulares de *E. Coli*, utilizados como controlo negativo para infeção de *Borrelia burgdorferi* f.l.;
- OspC (Outer Surface Protein C), C2 19-mer (DAASVNGIAKGIKGIVDAA) e C6 25-mer (MKKDDQIAAAMVLRGMAKDQGQFALK) todos juntos, são antigénios de infeção aguda provocada por *Borrelia burgdorferi* f.l.;
- OspE1/2 (Outer Surface Protein E1/2) juntos, OspA (Outer Surface Protein A) e DbpA (Decorin binding protein A), são antigénios de infeção crónica provocada por *Borrelia burgdorferi* f.l.;
- LFA1 (Lymphocyte Function Antigen-1) e Arp (Arthritis-related proteins GST-like self-antigen), são antigénios de infeção autoimune provocada por *Borrelia burgdorferi*;
- Péptidos de *Babesia microti* (com a sequência IVEFNALFSNIDLNNSTVKNEIIK) e *Ehrlichia* (com a sequência SAVSNRKLPLGGVLMALVAAVAPIHSALLA), provenientes de coinfeções;
- *Borrelia burgdorferi* B31 spirochete, *B. burgdorferi* B31 cysts, *Borrelia garinii* and *Borrelia azfeli*, utilizados como lisados celulares de controlo positivo para a infeção por *Borrelia* e para as suas espécies mais próximas.

Neste *bouquet*, 14 dos antígenos já tinham sido descobertos e 2 antígenos foram descobertos e produzidos especificamente para este *bouquet* de detecção da doença de Lyme, sendo eles os antígenos DbpA e Arp.

### 1.1. Clonagem do antígeno Decorin binding protein A (DbpA)

Para expressar o antígeno DbpA (rDbpA), selecionámos o plasmídeo pBAD/His A para expressão induzível em *E.Coli*. A proteína será expressa como uma proteína de fusão com uma 6-His-tag na posição N-terminal. A 6-His-tag é pequena, não imunogénica e permitirá a purificação através de ligação a matrizes de metais iónicos.

Inicialmente o plasmídeo de expressão foi amplificado e purificado (Midiprep QIAfilter Plasmid Purification Kit #12243). Seguidamente, 2 µg do plasmídeo e todo o amplicon de DbpA purificado foram digeridos com os enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII* durante a noite a 37° C, seguindo as condições da tabela abaixo descrita:

Digestão com <i>XhoI</i> e <i>HindIII</i>	Plasmídeo (µl)	DbpA (µl)
Água desionizada e livre de nucleases	25,5	35
ADN template	15	50
NEB 2 buffer (10x)	5	10
BSA (100x)	0,5	1
<i>XhoI</i> (20 u/ul)	2	2
<i>HindIII</i> (20 u/ul)	2	2
<b>Volume Final</b>	<b>50</b>	<b>100</b>

O plasmídeo e a proteína são corridos num gel de agarose a 0,8% (a 100 V durante 70 minutos) e purificados com

QiAQuick Gel Extraction. O DbpA clivado é depois ligado ao plasmídeo de digestão, num rácio de 1:3, durante 3 horas à temperatura ambiente, e 5  $\mu$ l transformados em células *E. coli* NEB 5-alpha (25  $\mu$ l). A mistura de transformação (200  $\mu$ l) é colocada em placas *Luria-Bertani* (LB), contendo estas placas 50  $\mu$ g de ampicilina por ml, e crescem durante a noite a 37°C.

Reagentes utilizados na reação de ligação	Rácio 1:3 ( $\mu$ l)	Sem o plasmídeo inserção ( $\mu$ l)	Sem plasmídeo de inserção e ADN ligase ( $\mu$ l)
Água desionizada e livre de nucleases	5	7	8
Tampão T4 Ligase (10x)	2	2	2
Plasmídeo de ADN (~10 ng/ $\mu$ l)	10	10	10
Plasmídeo de inserção (~25 ng/ $\mu$ l)	2	-	-
T4 ADN ligase (3U/ $\mu$ l, Promega, #M1801)	1	1	-
<b>Volume Final</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

Várias colónias positivas são amplificadas em 2 ml de LB (50  $\mu$ g de ampicilina/ml), purificadas (Miniprep QIAfilter Plasmid Purification Kit #37104), digeridas com *Xho*I/*Hind*III a 37°C durante 2 horas, e corridas em gel de agarose (1%), para confirmar a presença do gene DbpA.

São obtidas 5 minipreps positivas digeridas, das quais 2 se seleciona para sequenciação. Após confirmado que a sequência corresponde exatamente ao gene DbpA (incluído o His-tag), 200 µl de uma das culturas positivas das minipreps transformadas com TOP10, crescem em 200 ml de LB (100 µg de ampicilina/ml) a 37°C durante a noite. Seleciona-se TOP10 porque é uma estirpe de *recA/endA*, capaz de transporter L-arabinose, mas não a metaboliza. Estes 200 ml de cultura, o ADN de DbpA construído são purificados com Qiafilter Plasmid Midi kit (Qiagen #12243, transformado (2.8 µl, ~100 ng) em células TOP10 (15 µl), e cresce-se em placas de LB (100 µg/ml ampicillin) a 37°C durante a noite.

No fim, uma das colónias é novamente repicada para gerar stocks em glicerina e para expressar rDbpA.

## **1.2. Clonagem do antigénio Arthritis-related proteins GST-like self-antigen (Arp)**

Para a expressão da proteína recombinante Arp (rArp), é utilizada a proteína 6-His-tag com o mesmo plasmídeo utilizado na expressão do DbpA, plasmídeo pBAD/His A (Invitrogen).

O plasmídeo recombinante é amplificado e purificado como descrito na secção anterior para o DbpA, mas em vez de *HindIII* usa-se *EcoRI*.

1 µg de plasmídeo e todo o gene Arp amplificado e purificado são digeridos com *XhoI* e *EcoRI* durante 3 horas a 37°C, seguindo as condições da seguinte tabela:

Reagentes para a digestão com XhoI and EcoRI	Plasmídeo (µl)	Arp (µl)
Água desionizada e livre de nucleases	40	11.5
ADN template	1.5	30
NEB 4 buffer (10x)	5	5
BSA (100x)	0.5	0.5
XhoI (20 u/ul)	1.5	1.5
EcoRI (20 u/ul)	1.5	1.5
<b>Volume Final</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

O plasmídeo e a proteína são corridos num gel de agarose a 0,8% (a 100 V durante 70 minutos) e purificados com QiAQuick Gel Extraction. O Arp clivado é depois ligado ao plasmídeo de digestão, num rácio de 1:3, durante 75 minutos à temperatura ambiente, e 5 µl transformados em células *E. coli* NEB 5-alpha (25 µl). A mistura de transformação (200 µl) é colocada em placas *Luria-Bertani* (LB), contendo estas placas 50 µg de ampicilina por ml, e crescem durante a noite a 37°C.

Reagentes para a reação de ligação	Rácio 1:3 (µl)	Sem o plasmídeo de inserção (µl)	Sem plasmídeo de inserção e ADN ligase (µl)
Água desionizada e livre de nucleases	12.7	14.5	15.5
Tampão T4 Ligase (10x)	2	2	2
Plasmídeo de ADN (~10 ng/µl)	2.5	2.5	2.5
Plasmídeo de inserção (~25 ng/µl)	1.8	-	-
T4 ADN ligase (3U/µl, Promega, #M1801)	1	1	-
<b>Volume Final</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

Várias colônias positivas são amplificadas em 2 ml de LB (50 µg de ampicilina/ml), purificadas (Miniprep QIAfilter Plasmid Purification Kit #37104), digeridas com *XhoI/EcoRI* a 37°C durante a noite, e corridas em gel de agarose (1%), para confirmar a presença do gene Arp.

Duas colônias positivas das minipreps são selecionadas para sequenciação. Após confirmado que a sequência corresponde exatamente ao gene Arp (incluído o His-tag), 200 µl de uma das culturas positivas das minipreps transformadas com TOP10, crescem em 200 ml de LB (100 µg de ampicilina/ml) a 37°C durante a noite. A partir deste 200

ml de cultura, o ADN de Arp construído é purificado com Qiafilter Plasmid Midi kit (Qiagen #12243, transformado (1 µl, ~100 ng) em células TOP10 (15 µl), e cresce em placas de LB (100 µg/ml ampicillin) a 37°C durante a noite.

No fim, uma das colónias é novamente repicada para gerar stocks em glicerina e para expressar rArpn.

## **2. A utilização do conjunto inovador de antigénios num novo teste de ELISA**

Um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima competitivo (ELISA) para a deteção de anticorpos já é conhecido. A nossa técnica assemelha-se a um teste de ELISA porém é mais inovador, mais sensível, mais específico e mais preciso do que as técnicas conhecidas de ELISA. O teste inovador semelhante a um teste de ELISA da presente invenção é particularmente adequado para a detecção de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi f.l.* presentes numa amostra de um organismo possivelmente infetado. O aperfeiçoamento da técnica de ELISA da presente invenção reside na utilização de um bouquet especificamente desenhado para a deteção de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi f.l.*, que suprime as reações de ligação não-específicas entre o analito e o primeiro agente de ligação da reação. Além disso, o teste ELISA foi melhorado utilizando-se a técnica de remoção de possíveis contaminantes, uma vez que são utilizados antigénios alvo altamente específicos.

## **3. Biochip**

O Biochip contém o bouquet de antigénios (descritos no ponto 1, e representado pela figura 1 do caderno de desenhos) em câmaras microfluídicas, e foi construído da seguinte forma:

a) no Biochip todas as funções são integradas sem conexões externas (reservatórios de entrada, válvulas misturadoras, área de detecção e bombas de fluídos);

b) o Biochip (representado na figura 2 do caderno de desenhos) possui as propriedades desejadas de suavidade da parede e humidade da estrutura de canais de microfluidos e uma elevada relação de aspeto para permitir forças capilares fortes.

c) possui estruturas denominadas bombas capilares que permitem o transporte da amostra e dos reagentes até à câmara de detecção. Esta estrutura tem uma taxa de fluxo na ordem dos 0,4  $\mu\text{L}/\text{min}$ , permitindo um tempo de teste inferior a 20 minutos, e é capaz de bombear todo o volume de teste da amostra através da câmara de detecção.

d) possui uma câmara de detecção, na qual as imunoglobulinas, do soro humano, contra os antígenos de *Borrelia* são capturadas pelos antígenos imobilizados, com uma capacidade de imobilização superior a 1000 moléculas de proteína. As câmaras são desenhadas para serem compatíveis com um Leitor de quimio-luminescência específico e incluem as estruturas requeridas de direcionamento de ondas.

e) a abordagem da produção de um novo Biochip de baixo custo, altamente reprodutível e confiável.

f) Procedimentos para a imobilização dos antígenos na câmara de detecção e o revestimento de qDots com anticorpos contra soros humanos, para serem incorporados como reagentes para dentro do chip. A qualidade do revestimento da superfície da câmara, e os qDots foram avaliados utilizando técnicas do estado-da-arte.



g) integração de bombas e de válvulas no Biochip com baixo custo, uma vez que não são necessários atuadores externos. Este é um projeto muito simples, que compreende o bombeamento, válvulas, canais microfluídicos (cuja altura está demonstrada na figura 3 presente no caderno de desenhos), e reservatórios.

h) uma arquitetura aberta do design do Biochip, que pode ser adaptado para outras aplicações e doenças.

#### **4. Interpretação dos resultados do Biochip**

Inicialmente recolhe-se uma amostra do paciente, que está possivelmente infetado com a doença de Lyme. Esta amostra pode ser fluídica (urina, sangue total, soro, plasma, fluido cérebroespinal, suor, saliva) ou tecidular (lisados de tecidos). Adiciona-se 3  $\mu$ L da solução filtrada e diluída (1/200) da amostra em 0,1% de Tween 20/PBS e deixa-se na entrada apropriada do Biochip durante 9 minutos. Seguidamente remove-se o excesso de amostra e lava-se a respetiva entrada com 3  $\mu$ L de uma solução filtrada de 0,1% de Tween 20/PBS. Volta-se a remover o excesso da solução anterior e adiciona-se 3  $\mu$ L de uma solução de 1/10 de fQDot525, e de 1/100 fQDot625 e deixa-se na referida entrada durante 9 minutos. Novamente, remove-se o excesso da solução anterior e volta-se a fazer uma lavagem com 3  $\mu$ L de uma solução de 0,1% de Tween 20/PBS. Após realizado este procedimento o Biochip está pronto para ser lido num Leitor de quimio-luminescência apropriado.

Os qDots referidos acima são fundamentais, pois são agentes reveladores que permitirão a identificação da ligação entre o primeiro agente de ligação da reação (um dos 16 antigénios fixados no Biochip) com o analito (amostra) e por sua vez com o segundo agente de ligação da

reação (anticorpo IgG ou IgM). Se houver a ligação entre o primeiro agente de ligação de reação, o analito e o segundo agente de ligação da reação quando o Bichip for lido no Leitor de quimio-luminescência apropriado irá ser emitida fluorescência, indicando que os teste foi positivo para a doença de Lyme e o paciente está infetado com a bactéria *Borrelia*. Se não houver esta ligação, significa que a amostra do paciente não possui anticorpos contra a bactéria *Borrelia burgdorferi* f.l. e o paciente não se encontra infetado com a doença de Lyme.

### 5. Quantum Dots, agentes reveladores

QuantumDots (qDots) ou nanocristais são um grupo distinto de compostos fluorescentes que diferem dos fluoróforos convencionais na medida em que têm características espectrais únicas. Os seus núcleos de metais pesados são responsáveis por essas características espectrais originais e são compostos por material semiconductor, seleneto de cádmio (CdSe) ou fosfeto de índio e gálio (InGaP). Os núcleos possuem normalmente propriedades tecnológicas de revestimento que permite a sua conjugação com várias biomoléculas, incluindo anticorpos, proteínas e péptidos. Este revestimento é também um polímero anfifílico, que proporciona uma superfície solúvel em água que pode modificar a conjugação com outras biomoléculas, tais como anticorpos e proteínas. Estes nanocristais são ajustáveis em tamanho (2-50 nm), normalmente de 10-20 nm, possuem forma esférica, é esta forma esférica que permite que os qDots sejam ajustados para um comprimento de onda de emissão específico. Os qDots são intrinsecamente brilhantes, têm espectros de emissão muito estreitos, têm foto-estabilidade excecional, são fáceis de usar, e podem ser usados numa infinidade de aplicações. O uso destes nanocristais em aplicações

biomédicas está apenas a emergir e a ganhar popularidade. Devido às suas características espectrais fundamentais os qDots têm alto desempenho numa variedade de aplicações, tais como citometria de fluxo, imuno-histoquímica ou no nosso caso, como moléculas de detecção para os soros humanos.

No caso desta invenção, foram escolhidos os qDots 525 e os qDots 625. O número à frente de qDots corresponde ao pico de emissão do referido qDot, no nosso caso os qDots escolhidos para esta invenção irão ter picos de emissão a 525 nm (qDots 525) e 625 nm (qDots 625). Ambos os qDots serão conjugados com os nossos segundos agentes de ligação (IgG ou IgM) formando o complexo segundo agente de ligação-qDot. Este complexo por sua vez ir-se-á ligar ao complexo primeiro agente de ligação-analito (soro humano), no caso do soro possuir anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* f.l.. Se o complexo primeiro agente de ligação-analito-segundo agente de ligação-qDot quando o Biochip for colocado no Leitor de quimio-luminescência os qDots serão excitados ao comprimento de onda referido acima, e transmitirão fluorescência, acusando um diagnóstico positivo para a doença de Lyme.

### Bibliografia

1. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. Elisabet Lindgren and Thomas G.T. Jaenson. World Health Organization Regional Office for Europe 2006
2. Irwin T. Vanderhoof, PhD, CLU et al. (1993) Lyme Disease: The cost to society. Contingencies, Jan./Feb., p. 42-48
3. The emergence of Lyme Disease. Steere et al., The Journal of Clinical Investigation, 2004.
4. Wilske, Bettina (2005) 'Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis', Annals of Medicine.
5. [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld\\_humandisease\\_diagnosis.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld_humandisease_diagnosis.html)

2013-07-24

### Reivindicações

1. Ensaio de ligação de uma amostra de substância a analisar, compreendendo os passos de: 1- mistura em fase homogênea, numa série de recipientes de reação, de uma amostra para análise, com um conjunto inovador de antígenios que funcionam como primeiro agente de ligação, aguardando o analito de interesse presente na amostra formar um primeiro produto de mistura; 2- expondo o primeiro produto de mistura a um segundo agente de ligação, a fim de formar um segundo produto de mistura.
2. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado por o uso de 16 antígenios como primeiros agentes de ligação, no todo ou em parte, em igual recipiente de reação ou em recipientes separados para cada um dos agentes de ligação.
3. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do antígeno OspC (outer surface protein C), de *Borrelia burgdorferi* f.l., ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.
4. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do antígeno peptídico C2 19-mer, com a sequência SEQ. ID nº1, de *Borrelia burgdorferi* f.l., ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.
5. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do antígeno peptídico C6 25-mer, com a sequência SEQ. ID nº2, de *Borrelia burgdorferi* f.l., ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.
6. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do antígeno OspE1 (outer surface protein E1), de *Borrelia burgdorferi* f.l., ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.

7. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do antígeno OspE2 (*outer surface protein E2*), de *Borrelia burgdorferi* f.l., ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.
8. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do antígeno OspA (*outer surface protein A*), de *Borrelia burgdorferi* f.l. ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.
9. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do antígeno LFA1 (*lymphocyte function antigen-1*), de *Borrelia burgdorferi* f.l., ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.
10. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto dos péptidos obtidos a partir de *Babesia microti*, com a sequência SEQ. ID nº3, ser ou poderem ser utilizados como primeiro agente de ligação.
11. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto dos péptidos obtidos a partir de *Ehrlichia*, com a sequência SEQ. ID nº4, serem ou poderem ser utilizados como primeiro agente de ligação.
12. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto da espiroqueta de *Borrelia burgdorferi* B31 ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.
13. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do cisto de *Borrelia burgdorferi* B31 ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.
14. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto dos lisados celulares de *E.Coli* serem ou poderem ser utilizados como primeiro agente de ligação.
15. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto dos lisados celulares de

*Borrelia garinii* serem ou poderem ser utilizados como primeiro agente de ligação.

16. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto dos lisados celulares de *Borrelia azfelfii* serem ou poderem ser utilizados como primeiro agente de ligação.
17. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do antigénio DbpA (decorin binding protein A), de *Borrelia burgdorferi* f.l., ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.
18. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do antigénio Arp (arthritis-related proteins GST-like self-antigen), de *Borrelia burgdorferi* f.l., ser ou poder ser utilizado como primeiro agente de ligação.
19. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto do segundo agente de ligação ser um anticorpo.
20. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto dos anticorpos anti-IgG e anti-IgM serem utilizados como segundos agentes de ligação.
21. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº2, caracterizado pelo facto do segundo agente de ligação estar conjugado a um marcador químico.
22. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº2, caracterizado pelo facto do segundo agente de ligação estar conjugado a um enzima.
23. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº22, caracterizado pelo facto do anticorpo ser um anticorpo IgG ou IgM.
24. O ensaio de ligação de acordo com as reivindicações nº 22 e nº23, caracterizado pelo facto do anticorpo ser utilizado em diluições de 1:100, 1:1000 e 1:10000.
25. O ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, caracterizado pelo facto dos recipientes de reacção poderem fazer parte de um biochip onde vai

ocorrer a reação de reconhecimento do antigénio e do analito.

26. O biochip de acordo com a reivindicação nº25, caracterizado pelo facto de ser formado por câmaras, microcanais e válvulas sobre polimetil-metacrilato, material termoplástico rígido e transparente, também conhecido como PMMA.
27. O biochip de acordo com a reivindicação nº25, caracterizado pelo facto ser formado por câmaras, microcanais e válvulas sobre outro material polimérico conhecido comercialmente como Nalax3.
28. Os microcanais de acordo com as reivindicações nº 26 e nº27, caracterizados pelo facto de possuírem uma largura de 25 a 60 µm.
29. As câmaras de acordo com as reivindicações nº 26 e nº27, caracterizadas pelo facto de serem 16 microcâmaras de análise de reações imunológicas e detecção de fluorescência, com uma altura, largura e diâmetro de 5µm a 50µm.
30. As câmaras de acordo com as reivindicações nº 26 e nº27, caracterizadas pelo facto de conterem os 16 antigénios descritos da reivindicação nº3 à reivindicação nº18, um por cada câmara.
31. As válvulas de acordo com as reivindicações nº 26 e nº27, caracterizadas pelo facto de fazerem variar a largura do canal de 5 µm para 30 µm.
32. O biochip de acordo com a reivindicação nº25, caracterizado pelo facto de conter três entradas para as câmaras e canais, em sistema de entrada microfluidica, uma entrada para o analito, amostra do paciente, uma entrada para reagentes e uma entrada para as lavagens.
33. Os microcanais, válvulas e câmaras de acordo com as reivindicações nº 26 e nº27, caracterizados pelo facto de possuírem uma profundidade de 10 µm a 25 µm.



34. Os antigénios descritos da reivindicação nº3 à reivindicação nº18 e os anticorpos descritos na reivindicação nº19, caracterizados pelo facto de serem dispostos no biochip de acordo com a reivindicação nº 25 de acordo com a figura 1 presente no caderno de desenhos.
35. O biochip de acordo com a reivindicação nº 25, caracterizado pelo facto de ser revestido com poly-L-lysine.
36. O biochip de acordo com a reivindicação nº 25, caracterizado pelo facto de serem inseridos 5 a 30 pl dos antigénios descritos da reivindicação 3 à reivindicação 18 e dos anticorpos da reivindicação 19.
37. O procedimento utilizado no Biochip de acordo com a reivindicação nº 25, caracterizado pelos seguintes passos: adicionar 3 µL de uma solução filtrada e diluída na proporção de 1/200 de soro em 0,1% de Tween 20/PBS e deixar na entrada apropriada do biochip durante 9 minutos; remover o excesso da solução anterior e lavar com 3 µL de uma solução filtrada de 0,1% de Tween 20/PBS; remover o excesso da solução anterior e adicionar 3 µL de uma solução de 1/10 de fQDot525, e de 1/100 fQDot625 durante 9 minutos; remover o excesso da solução anterior e lavar com 3 µL de uma solução de 0,1% de Tween 20/PBS; o biochip fica desta forma pronto para o passo de deteção.
38. Os anticorpos de acordo com a reivindicação nº20, caracterizados pelo facto de estarem ligados a qDots, fQDot525, como mencionado na reivindicação nº21.
39. Os anticorpos de acordo com a reivindicação nº20, caracterizados pelo facto de estarem ligados a qDots, fQDot625, como mencionado na reivindicação nº21.

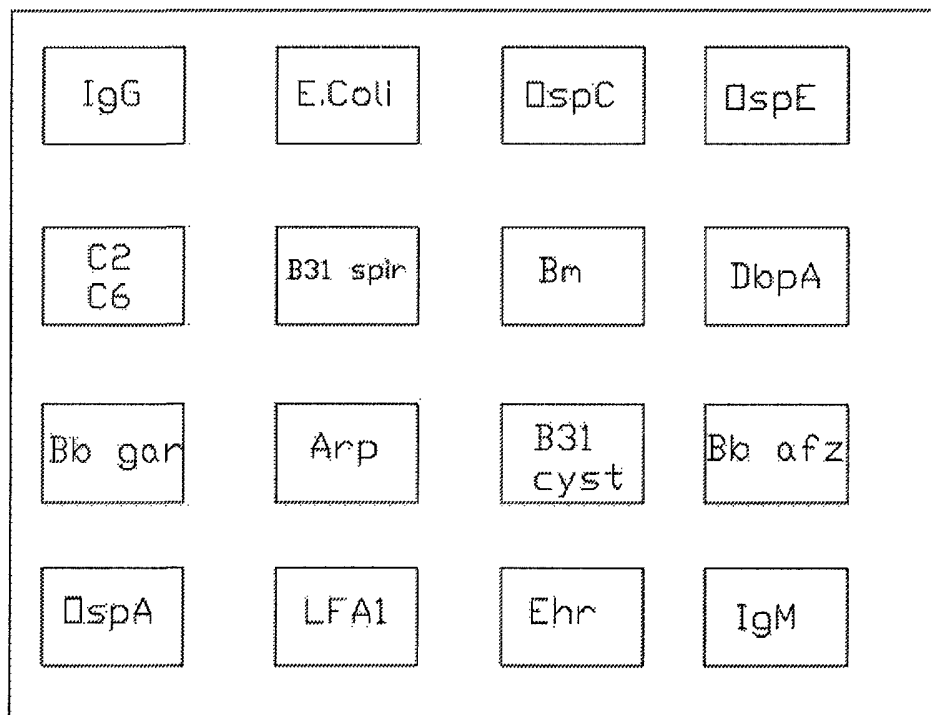
40. Os qDots de acordo com as reivindicações nº38 e nº39, caracterizado pelo facto de serem agentes reveladores que permitirão a identificação da ligação entre o primeiro agente de ligação da reação com o analito e por sua vez com o segundo agente de ligação da reação, por excitação da sua fluorescência e detecção num Leitor de quimio-luminescência.
41. Um método de diagnóstico, monitorização e avaliação da gravidade da doença de Lyme num mamífero, caracterizado pelo ensaio de ligação de acordo com reivindicação nº1 compreendendo os passos de: obtendo uma amostra do referido mamífero, seja ela um fluido biológico ou um tecido; fazendo entrar em contato a amostra referida em a) com partículas moleculares poliméricas multifuncionais, sob as condições nas quais um ou mais antígenos de *Borrelia burgdorferi* f.l. estão presos, concentrados e fracionados a partir de outras moléculas interferentes de maior abundância ou proteínas transportadoras; fazendo entrar em contato os ditos antígenos ou um fragmento de ligação do antígeno com pelo menos um anticorpo, sob condições nas quais complexos imunes serão formados entre os ditos anticorpos ou fragmentos e qualquer antígeno associado com *Borrelia burgdorferi* que possa estar presente na dita amostra; fazendo entrar em contato o complexo imune anticorpo-antígeno primário de *Borrelia burgdorferi* com um anticorpo secundário ligado a um marcador químico, que sobre determinadas condições formará um complexo entre o complexo imune anticorpo-antígeno primário de *Borrelia burgdorferi* e o anticorpo secundário; medição da quantidade de ligações entre antígenos de *Borrelia burgdorferi* f.l. e o complexo de anticorpos; detecção da presença dos antígenos como método de diagnóstico da doença de Lyme em mamíferos.
42. A amostra de acordo reivindicação nº1 e nº41 a), caracterizado pelo facto da amostra ser constituída por um ou mais dos seguintes fluidos ou amostras tecidulares: urina, sangue total, soro, plasma, fluido cérebrospinal, suor, saliva e lisados de tecidos.
43. O diagnóstico positivo para a doença de Lyme, caracterizado pelo facto de no final do ensaio de ligação de acordo com a reivindicação nº1, a presença do agente revelador ou dos qDots, de acordo com as reivindicações nº38 e nº39, ser detetada na câmara onde ocorreu o ensaio de ligação.

44. O diagnóstico negativo para a doença de Lyme, caracterizado pelo facto de no final do ensaio de ligação de acordo com a reivindicação n.º 1, a presença do agente revelador ou dos qDots, de acordo com as reivindicações n.º 38 e n.º 39, não ser detetada na câmara onde ocorreu o ensaio de ligação.

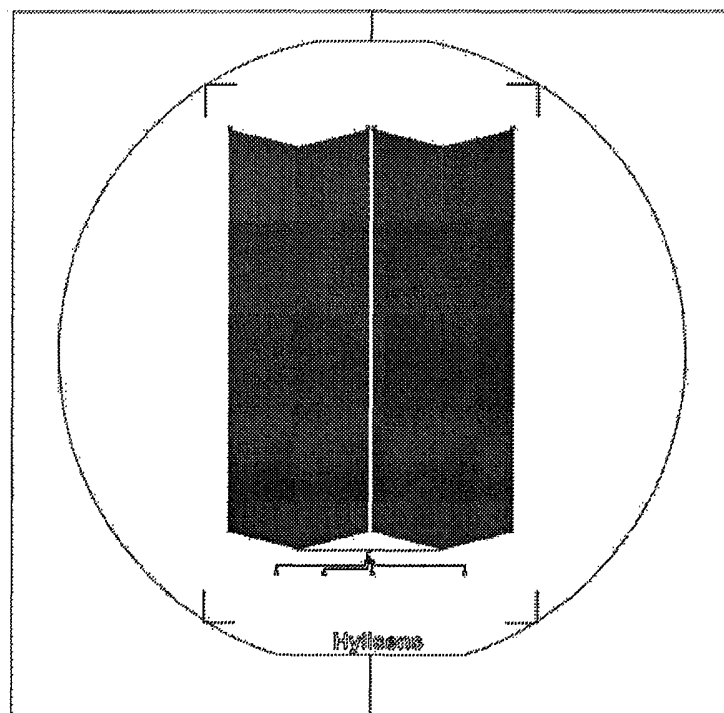
2013-10-07

## Caderno de desenhos

**Figura 1.** – Representação esquemática dos antígenos no Biochip



**Figura 2.** - Representação esquemática do Biochip.



**Figura 3.** - Representação esquemática da altura dos canais que constituem o Biochip.

