



**Assinado
Digitalmente**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1013447-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1013447-6

(22) Data do Depósito: 29/11/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 26/01/2016

(51) Classificação Internacional: C07K 14/44; G01N 33/569.

(54) Título: PEPTÍDEOS RECOMBINANTES, MÉTODO E KIT PARA TESTE IMUNODIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG. CGC/CPF: 17217985000104.
Endereço: Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, BRASIL(BR), 31270-901

(72) Inventor: ANA PAULA SALLES MOURA FERNANDES; RICARDO TOSTES GAZZINELLI; MÍRIAM MARIA SILVA COSTA FRANCO.

Código de Controle: 8D95D5CFAB88538E 4F72D5B9E1A79782

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 23/02/2021, observadas as condições legais

Expedida em: 23/02/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

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

Peptídeos Recombinantes, Método e Kit para Teste Imunodiagnóstico de Leishmaniose

A presente invenção descreve uma composição e kit para diagnosticar Leishmaniose visceral. Mais particularmente, a invenção trata da associação dos antígenos recombinantes definidos rA2 e rK39 ou seus epítomos, peptídeos 47 e 13 respectivamente, permitindo o desenvolvimento de um método diagnóstico com maior especificidade, otimizando, assim, a reatividade dos testes sorológicos.

Espécies do gênero *Leishmania* são agentes etiológicos das diferentes formas clínicas das leishmanioses (visceral, cutânea, mucocutânea e difusa) que, por sua vez, apresentam distribuição geográfica e prevalências distintas. Dentre os 88 países em que é registrada a ocorrência de leishmanioses, 72 são países em desenvolvimento e 13 estão entre os menos desenvolvidos do mundo. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) ocorrem no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão e 90% dos casos de leishmaniose cutânea (LC) ocorrem no Brasil, Afeganistão, Argélia, Iran, Peru, Arábia Saudita e Síria (World Health Organization. 2002. Leishmaniasis Strategic Direction. "<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>"; Murray, H. W. J. D. Berman. 2005. "Advances in leishmaniasis." Lancet 366(9496): 1561-77). Cabe aqui ressaltar que a LV, quando não tratada, é normalmente fatal.

Em diferentes regiões geográficas, o ciclo de transmissão da doença se estabelece quando se encontram próximos, em um ambiente favorável, os vetores infectados (fêmeas de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*) por formas promastigotas de alguma das várias espécies de *Leishmania* e o hospedeiro definitivo (mamíferos, sendo o homem hospedeiro acidental). Formas promastigotas, após terem sido introduzidas na pele dos hospedeiros definitivos, são fagocitadas e se transformam em formas amastigotas, que permanecem em contato com o sistema imune do hospedeiro durante a infecção ativa. O cão é considerado o principal reservatório doméstico da LV em nosso meio (Matlashewski, G. 2001. *Leishmania* infection and virulence: Med Microbiol. Immunol., 190: 37-42).

O controle da leishmaniose visceral (LV) no Brasil se faz por meio da eliminação dos reservatórios domésticos da doença (cães infectados), controle das populações de vetor e, quando possível, pela prevenção do contato com vetores infectados. Cães infectados, sintomáticos ou não, podem transmitir os parasitas ao inseto vetor (Courtenay, O., R. J. Quinnell, L. M. Garcez, J. J. Shaw, and C. Dye. 2002. infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.* 186:1314–1320). Assim, a prevalência e incidência da infecção canina são parâmetros fundamentais para o controle da transmissão. No entanto, a estimativa das mesmas depende de métodos confiáveis de identificação dos cães infectados (Dye, C., E. Vidor, and J. Deneure. 1993. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as pouco as disease. *Epidemiol. Infect.* 103:647–656; Dye, C., R. Killick-Kendrick, M. M. Vitutia, R. Walton, M. Killick-Kendrick, A. E. Harith, M. W. Guy, M.-C. Canavate and G. Hasibeder. 1992. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. *Parasitology* 105:35–41; Quinnell, R. J., O. Courtenay, L. Garcez, and C. Dye. 1997. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 115:143–156). Estudos baseados em modelagem matemática indicam, no entanto, que medidas de controle baseadas na detecção sorológica dos cães falham devido à alta incidência da infecção em cães e à alta infectividade dos parasitas, à falta de sensibilidade dos testes de diagnóstico sorológico e à demora entre diagnóstico e eliminação dos cães positivos, entre outros aspectos (Courtenay et al. 2002).

A aplicação das medidas de controle da LV no Brasil é extremamente complexa e onerosa, devido ao complexo ciclo de transmissão da doença, que envolve reservatórios domésticos, silvestres e insetos vetores, à precária condição sócio-econômica da população em muitas regiões do país e à urbanização e expansão da doença para áreas onde, até recentemente, ela não era registrada. Outros aspectos referem-se às diferenças ecoepidemiológicas da doença em diferentes regiões do país, à baixa

sensibilidade dos testes de diagnóstico sorológicos convencionais, especialmente para a detecção de cães que se encontram nos estágios iniciais da doença, e à demora entre o diagnóstico e eliminação dos cães infectados. Recentemente, a introdução de uma vacina no mercado contra a LV canina (Leishmune® - FordDodge), constituída de complexo antigênico FML purificado de formas promastigotas, tem dificultado a adoção dessas medidas de controle, uma vez que cães vacinados se tornam soropositivos nos testes convencionais empregando antígenos de formas promastigotas dos parasitas. Esse aspecto relaciona-se à presença dos mesmos antígenos na vacina e nos testes de diagnóstico sorológico que empregam formas promastigotas do parasita. Essa dificuldade poderia ser contornada empregando-se vacinas que não induzem soroconversão dos cães nos testes de diagnóstico empregando antígenos de formas promastigotas ou empregando-se nos testes sorológicos antígenos distintos daqueles presentes nas vacinas. Independentemente das características específicas de cada vacina, em um cenário complexo como esse, a introdução de novas ferramentas de controle pressupõe a não interferência com as demais medidas de controle vigentes.

O diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é conduzido por meio de testes sorológicos e parasitológicos em aspirados de baço, medula óssea, biópsia das lesões e linfonodos (WHO, 2002; Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN. 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis. Expert Rev Mol Diagn. 3(5):657-67). Devido às limitações dos métodos de diagnóstico direto, tais como microscopia, cultura e inoculação em hamsters de amostras de biópsia, a presença de anticorpos contra os parasitas por meio de reação de imunofluorescência ou ELISA empregando antígenos de formas promastigotas de *Leishmania sp.* é pesquisada rotineiramente como marcador de infecção (Dye et al., 1993; Grimaldi, G., Jr., and R. B. Tesh. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev. 6:230–250; Tavares et al., 2003).

Vários tipos de testes sorológicos e antígenos têm sido avaliados, mas a sorologia é, em geral, menos específica do que a detecção de parasitas em amostras de biópsia, devido à reatividade cruzada com outros agentes como

Erlichia canis e riquétsias. Os testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico indireto incluem a reação de imunofluorescência (IFAT), ELISAs, dot-ELISA, teste de aglutinação direta, Western blotting, e teste imunocromatográfico (Mancianti, F. and N. Meciani. 1988. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counter-immunoelectrophoresis. Am. J. Vet. Res. 49:1409–1411; Badaró, R., D. Benson, M. C. Eulálio, M. Freire, S. Cunha, E. M. Neto, D. Pedral-Sampaio, C. Madureira, J. M. Burns, R. L. Houghton, J. R. David, and S. G. Reed. 1996. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. J. Infect. Dis. 173:758–761; Vercammen, F., D. Berkvens, J. Brandt, and W. Vansteenkiste. 1998. A sensitive and specific 30-min Dot-ELISA for the detection of anti-leishmania antibodies in the dog. Vet. Parasitol. 79:221–228; Harith, A., A. H. Kolk, P. A. Kager, J. Leeuwenburg, R. Muigai, S. Kiugu, and J. J. Laarman. 1986. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80:583–587; Aisa, M. J., S. Castillejo, M. Gallego, R. Fisa, M. C. Riera, M. De Colmenares, S. Torras, X. Roura, J. Sentis, and M. Portus. 1998. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 58:154–159; Teodoro da Costa, R., J. C. Franc, a, W. Mayrink, E. Nascimento, O. Genaro, and A. Campos-Neto. 2003. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 97:678–682). A avaliação destes testes indica que, em geral, eles apresentam sensibilidade adequada para o sorodiagnóstico da LVC, em cães sintomáticos.

Além dos testes sorológicos, testes imunocitoquímicos e moleculares, baseados em reações de PCR, também foram desenvolvidos para detecção de DNA de *Leishmania* em amostras humanas e de cães (Quinnell, R. J., O. Courtenay, S. Davidson, L. Garcez, B. Lambson, P. Ramos, J. J. Shaw, M. A. Shaw, and C. Dye. 2001. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and immune response in a cohort study of Brazilian dogs. Parasitology

122:253–261; Reithinger, R., R. J. Quinnell, B. Alexander, and C. R. Davies. 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. J. Clin. Microbiol. 40:2352–2356). Entretanto, estes testes são laboriosos e de custo elevado, pois requerem equipamentos especializados e corpo técnico treinado, o que inviabiliza a sua aplicação em muitos casos. Estudos sugerem que a PCR é mais útil para detectar infecção ativa enquanto a sorologia pode ser mais sensível para detecção de todos os animais infectados (Quinnell et al., 2001).

O diagnóstico sorológico da LVC por ELISA empregando extrato de promastigotas ou Reação de Imunofluorescência ainda possui limitações relacionadas ao preparo e padronização dos antígenos de formas promastigotas e também pelo fato de requerer pessoal treinado e equipamentos especializados, dificultando sua aplicação rápida. Testes mais rápidos, como a imunocromatografia utilizando antígenos de proteínas recombinantes de *L. infantum*, como o K39 (rK39) e rK26, tem auxiliado no diagnóstico de casos de LVC sintomáticos. Nota-se, no entanto, limitações para diferenciar cães assintomáticos de sintomáticos. Outro teste foi introduzido no mercado recentemente pela empresa Biogene, contendo o antígeno recombinante HSP70, denominado S7. No entanto, detecta-se uma escassez de dados da literatura em relação à avaliação de sensibilidade e especificidade e validação desse teste.

Outro aspecto que deve ser ressaltado refere-se ao fato que o Ministério da Saúde investiu na implantação e capacitação de laboratórios em todo o país para o diagnóstico sorológico da LVC e que esse esforço não deve ser desperdiçado, mas sim aprimorado. Testes de diagnóstico moleculares se apresentam como alternativas devido a sua alta sensibilidade, mas são ainda laboriosos e onerosos. Desta forma, o aprimoramento de testes de diagnóstico sorológico que possam se valer da infra-estrutura e capacitação instaladas tem óbvias vantagens para a aplicação no SUS.

O antígeno A2, expresso pelas formas amastigotas de espécies viscerotrópicas, pertence a uma família de proteínas que possui um número

variável de repetições de uma unidade de 10 aminoácidos, sendo considerado o primeiro fator de virulência amastigota específico descrito (Charest, H. and G. Matlashewski. 1994. "Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene." Mol Cell Biol 14(5): 2975-84; Zhang, W. W. and G. Matlashewski. 1997. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. Proc Natl Acad Sci U S A 94(16): 8807-11). A2 se mostrou reativo em 60 e 82% dos pacientes soropositivos com o kala-azar da Índia e do Sudão, respectivamente no teste de ELISA (Ghedin, E., W. W. Zhang, H. Charest, S. Sundar, R. T. Kenney, and G. Matlashewski. 1997. Antibody response against *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:530–535). No Brasil, os anticorpos anti-A2 foram detectados por ELISA em 77% dos soros dos pacientes com LV sintomático e em 87% dos soros dos cães positivos pela IFAT para *Leishmania* ou na avaliação parasitológica (Carvalho, F. A. A., H. Charest, C. A. P. Tavares, G. Matlashewski, E. P. Valente, A. Rabello, R. T. Gazinelli, and A. P. Fernandes. 2002. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 43:289–295). Em um estudo recente, foram avaliados comparativamente os antígenos recombinantes parasita-específicos rK39, rK26 e rA2 e o antígeno solúvel (CSA) em testes de ELISA (Porrozzi, R., M. V. S. Costa, A. Teva, A., Campos-Neto, A., Fernandes, A.P., Gazzinelli, RT., Grimaldi, G. Jr. 2007. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. Clinical and Vaccine Immunology 14:544-548). Os resultados mostraram que estes marcadores apresentam sensibilidade elevada para o diagnóstico da LVC em cães sintomáticos, que apresentam em geral elevados títulos de anticorpos. No entanto, quando foi calculada a razão entre casos sintomáticos e assintomáticos que foram identificados por cada antígeno, A2 foi o antígeno que apresentou o mais alto índice, seguido por K39, K26 e CSA, sugerindo associação entre resposta a A2 e imunidade protetora. Além disso, a

especificidade do teste empregando A2 foi de 96%, enquanto para os outros antígenos variou entre 85 a 90% (Porrozzi et al. 2007). Esses dados sugerem que esses marcadores podem se complementar aumentando a sensibilidade total dos testes de detecção de anticorpos em cães sintomáticos e assintomáticos infectados por espécies de *leishmania* que causam a LVC.

Embora os dados apresentados por Porrozzi et al. (2007) demonstrem uma considerável melhoria na sensibilidade e especificidade de testes com antígenos recombinantes em comparação com testes empregando extrato antigênico, observa-se que ainda existem limitações em relação a uma menor sensibilidade dos testes empregando os antígenos K39, K26 e extrato antigênico em relação ao diagnóstico de cães assintomáticos. Esses animais tendem em geral a apresentar títulos de anticorpos mais baixos, menores que 1:640. No entanto, animais assintomáticos podem apresentar os parasitos na pele e representar uma importante fonte de transmissão dos mesmos para os vetores, resultando na manutenção da transmissão da infecção e sendo um dos fatores importantes para a falência das medidas de controle. Assim, testes mais sensíveis e específicos, capazes de detectar cães assintomáticos e/ou com baixos títulos de anticorpos, se fazem ainda necessários. Considerando que a detecção e o sacrifício de cães com sorologia positiva ainda é adotado no Brasil como medida de controle e que animais com baixos títulos de anticorpos e assintomáticos podem transmitir a infecção, o emprego de testes de diagnóstico com maior sensibilidade para esse tipo de animal pode apresentar impacto favorável sobre as medidas de controle da leishmaniose visceral no Brasil.

A associação de antígenos definidos é uma estratégia importante para o aprimoramento dos métodos de diagnóstico sorológico, uma vez que antígenos recombinantes, tais como rK39, rK26 e rA2, apesar de apresentarem elevada especificidade, quando empregados isoladamente podem apresentar menor sensibilidade (Carvalho et al. 2002; Porrozi et al., 2007). No entanto, estes marcadores apresentam o potencial de se complementarem aumentando a sensibilidade total nos testes sorológicos de cães sintomáticos (Porrozzi et al., 2007). Assim, combinações de antígenos podem ser mais sensíveis do que

uma única proteína ou epítopo, considerando a heterogeneidade genética das populações caninas. Antígenos recombinantes também podem apresentar especificidade reduzida se epítopos presentes em sua seqüência são também compartilhados por moléculas ortólogas presentes em outros organismos.

- 5 Usando métodos moleculares esses problemas podem ser contornados com a remoção destas seqüências, resultando em moléculas otimizadas tanto para sensibilidade quanto especificidade. Instrumentos disponíveis *on line* podem ser úteis para predição de epítopos de células B. A partir de um antígeno com seqüência conhecida e que tenha apresentado reatividade com soros de cães
- 10 e pacientes com leishmaniose visceral, pode-se identificar as porções da molécula com maior afinidade por anticorpos, sintetizar os peptídeos correspondentes, otimizando em cada molécula a reatividade em testes sorológicos.

- Tal abordagem foi empregada no presente estudo, selecionando, a partir
- 15 das seqüências dos antígenos A2 e K39, peptídeos correspondentes a regiões com características ótimas para reatividade como epítopos para células B. Assim, a presente invenção descreve um método e Kit para diagnosticar Leishmaniose através da associação dos antígenos definidos rA2 e rK39 ou seus epítopos, permitindo o desenvolvimento de um método diagnóstico com
- 20 maior sensibilidade, otimizando, dessa forma, a reatividade dos testes sorológicos.

Já se encontram documentos de patentes que descrevem o uso de antígenos de *leishmania* e a combinação destes no diagnóstico da Leishmaniose. Dentre estes, pode-se citar:

- 25 O documento US20100136046- RECOMBINANT POLYPROTEIN VACCINES FOR THE TREATMENT AND DIAGNOSIS OF LEISHMANIASIS- descreve composições e métodos para prevenir, tratar e detectar leishmaniose. As composições geralmente incluem polipeptídeos de fusão compreendendo múltiplos antígenos de *Leishmania*, em particular, A2 KMP11, SMT, e /ou CBP,
- 30 ou porções imunogênicas ou variantes das mesmas, bem como polinucleotídeos codificando tais polipeptídeos de fusão.

O documento US20060211056- *LEISHMANIA* ANTIGENS SUITABLE FOR A DIAGNOSTIC KIT OF *LEISHMANIA*- descreve a obtenção de polipeptídeos de 10 aminoácidos consecutivos purificados a partir de *Leishmania infantum*. E, ainda, o uso desses polipeptídeos para diagnosticar

5 LV Mediterrânea.

O documento US7740859- POLYPEPTIDES FOR THE DIAGNOSIS AND THERAPY OF LEISHMANIASIS- descreve compostos e métodos para a detecção de anticorpos anti-leishmania em indivíduos suspeitos de infecção com o parasita protozoário do gênero *Leishmania*, onde o agente infeccioso é

10 uma cepa indiana ou semelhante à cepa de *Leishmania indiana*.

O documento PI9405713-3- DIAGNOSE DA LEISHMANIOSE- descreve um método para o diagnóstico da leishmaniose que compreende: (a) obter uma amostra a partir de um paciente sob suspeita de estar infectado com o parasita *Leishmania* contendo anticorpos do paciente e (b) determinar a presença de

15 anticorpos que se ligam a uma unidade repetitiva do antígeno K39.

O documento WO2010020028- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E POLÍMERO PARA IMUNIZAÇÃO CONTRA A LEISHMANIOSE- descreve dois peptídeos antigênicos sintéticos (epítomos ou mimotopos) selecionados e o método de conjugação desses peptídeos para formar um polímero. O polímero

20 antigênico formado por esses peptídeos produz imunização contra leishmaniose visceral e será usado em método e kit imunodiagnóstico específico para detectar a doença.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1 - Reatividade do peptídeo 47 (1µg/poço) frente a soros de cães que

25 apresentam altos títulos de anticorpos (>1:640). Observa-se que nessas condições o peptídeo foi capaz de detectar 100% dos cães com altos títulos de anticorpos, apresentando alta sensibilidade e especificidade do peptídeo 47 com soros de cães com altos títulos de anticorpos.

Figura 2 - Reatividade do peptídeo 47 (1µg/poço) frente a soros de cães

30 sintomáticos e assintomáticos. Observa-se que, nessas condições, o peptídeo 47 foi capaz de detectar de forma comparável soros de cães sintomáticos e

assintomáticos, representando, portanto, uma otimização da sensibilidade apresentada quando a proteína A2 recombinante foi testada frente aos mesmos soros, como descrito por Porrozzi et. al. (2007).

Figura 3 - Reatividade do peptídeo 13 (4µg/poço) frente a soros de cães que apresentam altos títulos de anticorpos (>1:640). Observa-se que nessas condições o peptídeo foi capaz de detectar 100% dos cães com altos títulos de anticorpos, apresentando alta sensibilidade e especificidade do peptídeo 13 com soros de cães com altos títulos de anticorpos.

Figura 4 - Reatividade do peptídeo 13 (250 ng/poço) frente a soros de cães sintomáticos e assintomáticos. Observa-se que, nessas condições, o peptídeo 13 foi capaz de detectar de forma comparável soros de cães sintomáticos e assintomáticos, representando, portanto, uma otimização da sensibilidade apresentada quando a proteína A2 recombinante foi testada frente aos mesmos soros, como descrito por Porrozzi et. al. (2007).

Figura 5 - Reatividade dos peptídeos 13 e 47 (500 ng/poço), frente a soros de cães com títulos baixos (< 1:320) e médios (>1:320<1:640). Esses soros são provenientes de animais com exame parasitológico positivo, mas com títulos de anticorpos baixos ou médios, como detectado na reação de imunofluorescência com formas promastigotas do parasita ou em ELISA com extrato antigênico de formas promastigotas do parasita, testes convencionais para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

Figura 6 - Dados das reações de ELISA em que os 2 peptídeos foram testados isoladamente na quantidade de 4µg/poço. Na Figura 7, são apresentados os dados das reações de ELISA em que os 2 peptídeos foram testados em associação

Figura 7 - Dados das reações de ELISA em que os 2 peptídeos foram testados em associação.

Descrição Detalhada da Invenção

Na presente invenção foi feita uma combinação de peptídeos correspondentes a regiões com características ótimas para reatividade como epítomos para células B selecionados a partir das sequências dos antígenos A2

e K39 de *leishmania*, empregando os critérios descritos na tabela 1. Tais peptídeos foram então testados, isoladamente ou em combinação, frente a soros de cães sintomáticos, assintomáticos e com baixos e médios títulos de anticorpos. Cumpramos ressaltar que foram empregados nessa análise, os mesmos soros categorizados como provenientes de cães sintomáticos e assintomáticos testados previamente por Porrozzi et al. (2007), permitindo a comparação com os mesmos antígenos sob a forma de proteínas recombinantes. Os peptídeos foram testados também frente a soros humanos de pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral e soros controle de indivíduos hígidos.

As sequências das proteínas A2 e K39 foram submetidas a análise com programas disponíveis online no site <http://www.expasy.org/tools/protscale.html>. Os programas aos quais as sequências foram submetidas geram gráficos e valores de scores que são considerados de acordo com as características ideais para a presença de epítomos de células B. A seleção das sequências sintetizadas como peptídeos com características de epítomos de células B obedeceu os seguintes critérios:

Tabela 1- Critérios utilizados para seleção das sequências sintetizadas

Característica	Referência	Valores de Scores
Regiões com estrutura Beta sheet	de acordo com Chou & Fasman	deve ser baixo
Regiões com estrutura Alfa hélice	/ Deleage & Roux	deve ser alto
Hidrofobicidade	/ Hopp & Woods	deve ser alta
Regiões com estrutura Alfa hélice	Chou & Fasman	deve ser alto

Regiões com estrutura Beta-turn	Chou & Fasman	deve ser alto
Coil	Deleage & Roux	deve ser baixo
Porcentagem de resíduos acessíveis		deve ser alta

Com base nesses critérios, foram selecionadas as seguintes sequências: SVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSC, correspondendo ao Peptídeo 47(SEQ ID N°1), derivado do antígeno A2 e SESTTAAKMSAEQDRESTRATLEC, correspondendo ao Peptídeo 13 (SEQ ID N°2), derivado do antígeno K39 (kinesin 39). Resíduos de serina (S) e cisteína (C) foram acrescentados às extremidades dos peptídeos para otimizar os processos de sensibilização de placas de ELISA e complexação com ouro coloidal, respectivamente.

A presente invenção será melhor descrita através dos exemplos a seguir. Ressalta-se que esses exemplos não possuem a intenção de limitar a natureza da invenção, mas, ao contrário, ilustram e ajudam na compreensão da tecnologia.

Ainda, o teste para imunodiagnóstico de leishmaniose pode ser selecionado do grupo compreendendo ELISA, Western blot, dot blot e imunodifusão e imunocromatografia. Nos exemplos que se seguem foi utilizado o teste de ELISA.

Exemplo 1

Para testar a reatividade do peptídeo 47 como antígeno em testes de diagnóstico da leishmaniose visceral canina, o mesmo foi utilizado para sensibilizar placas de ELISA, de acordo com o protocolo descrito a seguir.

Placas de 96 poços (Flexible PVC Microplates, flat-bottom, BD Biosciences) foram sensibilizadas com o peptídeo sintético 47, derivado do antígeno A2, diluído em água. Foram testadas variações nas quantidades de

peptídeo por poço, dependendo do ensaio (4 ou 1 µg/poço ou ainda 0,5 ou 0,250 µg/poço). As placas foram mantidas em estufa até a secagem e depois na geladeira por 18 horas a 4 °C. As placas foram bloqueadas com PBS-2% caseína a 37 °C por 1 hora e incubadas com soros de cães na diluição de 1:100 por 1 hora a 37 °C. Anticorpos marcados com Peroxidase específicos para IgG canina (Sigma, USA) foram diluídos 1:5000 e adicionados aos poçopoços por 1 hora a 37 °C. Após a lavagem das placas, foi adicionado o substrato cromogênico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em tampão citrato contendo peróxido de hidrogênio. As reações foram interrompidas pela adição de H₂SO₄ 2N. A densidade ótica foi determinada a 450 nm em leitor de ELISA (BioRad, Model 2550, CA, USA).

Através da Figura 1 pode-se observar que o peptídeo foi capaz de detectar 100% dos cães com altos títulos de anticorpos, apresentando a alta sensibilidade e especificidade do peptídeo 47 frente a soros de cães com altos títulos de anticorpos.

Exemplo 2

Observada a elevada reatividade do peptídeo 47 (4 µg/poço) com soros de cães com títulos altos de anticorpos (> 1:640), verificou-se também a possibilidade do mesmo reagir com soros de cães sintomáticos e assintomáticos, mas empregando uma menor quantidade de antígeno (250 ng/poço). Ressalta-se que foram empregados os mesmos soros utilizados por Porrozzi et. al. (2007).

Na Figura 2 observa-se que o peptídeo 47 foi capaz de detectar de forma comparável soros de cães sintomáticos e assintomáticos, representando, portanto, uma otimização da sensibilidade apresentada quando a proteína A2 recombinante foi testada frente aos mesmos soros, como descrito por Porrozzi et. al. (2007).

Exemplo 3

Para testar a reatividade do peptídeo 13 como antígeno em testes de diagnóstico da leishmaniose visceral canina, o mesmo foi utilizado para sensibilizar placas de ELISA na quantidade de 4 µg/poço, de acordo com o protocolo de reações de ELISA descrito no exemplo 1. Inicialmente o peptídeo

13 foi utilizado na quantidade de 4µg/poço frente a soros de cães com títulos altos (>1:640) de anticorpos.

Na Figura 3 observa-se que o peptídeo foi capaz de detectar 100% dos cães com altos títulos de anticorpos, apresentando a alta sensibilidade e do peptídeo 13 frente soros de cães com altos títulos de anticorpos.

Exemplo 4

Tendo sido observada elevada reatividade do peptídeo 13 (4µg/poço) com soros de cães com títulos altos de anticorpos (> 1:640), verificou-se, então, a possibilidade do mesmo reagir com soros de cães sintomáticos e assintomáticos, mas empregando uma menor quantidade de antígeno (250 ng/poço). Ressalta-se que foram empregados os mesmos soros utilizados por Porrozzi et. al. (2007).

Na Figura 4 observa-se que o peptídeo 13 foi capaz de detectar de forma comparável soros de cães sintomáticos e assintomáticos, representando, portanto, uma otimização da sensibilidade apresentada quando a proteína A2 recombinante foi testada frente aos mesmos soros, como descrito por Porrozzi et. al. (2007).

Exemplo 5

Considerando que a detecção de cães com baixos títulos de anticorpos ainda é uma limitação de testes de diagnóstico que empregam os antígenos K39 e K26, como demonstrado por Porrozzi et al. (2007), os peptídeos 13 (derivado de K39) e 47 (derivado de A2) foram testados em associação com o intuito de aumentar a sensibilidade para soros de cães com baixos títulos de anticorpos.

Foi comparada a reatividade dos peptídeo 13 e 47 (500 ng/poço), frente a soros de cães com títulos baixos (< 1:320) e médios (>1:320<1:640). Esses soros são provenientes de animais com exame parasitológico positivo, mas com títulos de anticorpos baixos ou médios, como detectado na reação de imunofluorescência com formas promastigotas do parasita ou em ELISA com extrato antigênico de formas promastigotas do parasita, testes convencionais para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Observa-se na Figura 5 que, nessas condições, a associação do peptídeo 47 ao peptídeo 13 foi capaz

de aumentar a sensibilidade do teste, resultando, portanto, em uma otimização da sensibilidade apresentada pelo peptídeo 13. Resultados similares foram obtidos com 250 ng/poço.

Os dados apresentados na Figura 5 são detalhados na tabela 2.

- 5 Observa-se que, isoladamente, o peptídeo 13 foi capaz de detectar como positivos 17 soros de cães com baixos títulos de anticorpos ($<1:320$) e 15 com títulos médios ($> 1:320$ e $< 1:640$). Quando os peptídeos 13 e 47 são associados em uma mesma reação, foram detectados como positivos 20 soros com títulos baixos e 19 com títulos médios, apresentando dessa forma maior
- 10 sensibilidade.

Tabela 2: Avaliação da combinação dos peptídeos 13 e 47 (500 ng/poço) para o diagnóstico da leishmaniose visceral em soros de cães com títulos de anticorpos baixos ($<1:320$) e médios ($> 1:320$ e $< 1:640$).

Sensibilização		Peptídeo 13		Peptídeos 13 e 47	
Soros		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Títulos baixos (n=20)		0.6170	0.2332	0.8540	0.2250
Títulos médios (n=20)		0.7440	0.3330	0.8570	0.3650
Negativos (n=14)		0.2740	0.0550	0.3120	0.0640
Cut off (média + 2 desvios padrão)		0.3840		0.4390	
		Número de soros acima do Cut Off		Número de soros acima do Cut Off	
Títulos (n=20)	baixos	17		20	
Títulos (n=20)	médios	15		19	

Exemplo 6

Os peptídeos 13 e 47 foram empregados também em reações de ELISA com soros de pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral, tendo como controles soros de indivíduos hígidos. Na Figura 6, são apresentados os dados das reações de ELISA em que os 2 peptídeos foram testados isoladamente na quantidade de 4µg/poço. Isoladamente, os peptídeos 13 e 47 apresentaram sensibilidade de 93% e 90%, respectivamente. O valor encontrado para o peptídeo 13, correspondente ao antígeno K39 é o mesmo descrito na literatura (Machado de Assis et. al., 2008) para teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® (DiaMed IT-LEISH®) que emprega o antígeno K39. Nesse mesmo estudo, as técnicas RIFI (imunofluorescência indireta), ELISA *L. chagasi* e ELISA rK39 apresentaram sensibilidade de 88%, 92% e 97%, respectivamente, para o diagnóstico da LV humana.

Na Figura 7, são apresentados os dados das reações de ELISA em que os 2 peptídeos foram testados em associação. Observa-se aumento de sensibilidade quando os 2 peptídeos foram associados, alcançando um valor de 100%. Esses resultados demonstram a capacidade dos peptídeos testados de otimizar a sensibilidade dos testes para detecção de leishmaniose visceral humana, incluindo aqueles que empregam o antígeno K39.

REIVINDICAÇÕES

1. **Peptídeos recombinantes de *Leishmania* caracterizados por** consistir das sequências SEQ ID N^{os} 1 e 2.
2. **Peptídeos recombinantes de *Leishmania*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por** serem modificados em suas extremidades com acréscimos de resíduos de serina e cisteína.
3. **Método para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose caracterizado por** compreender:
 - a. Ligação de anticorpos leishmaniais de uma amostra a um ou mais polipeptídios, ligados a um suporte sólido ou um carreador, consistindo das sequências de aminoácidos SEQ ID N^{os} 1 e 2;
 - b. Contatar os anticorpos do passo (a) com um anticorpo secundário ou uma proteína, conjugados a uma enzima ou a um marcador e que se ligam aos anticorpos do passo (a);
 - c. Detectar os anticorpos antileishmaniais na amostra supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligados ao dito anticorpo anti-leishmanial.
4. **Método para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelos** polipeptídios consistindo das sequências de aminoácidos SEQ ID N^{os} 1 e 2 serem modificados em suas extremidades com acréscimos de resíduos de serina e cisteína.
5. **Método para teste Imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelas** amostras serem selecionadas do grupo consistindo de sangue, soro, plasma e outro fluído corporal.
6. **Método para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo** suporte sólido ser

selecionado de um grupo de materiais consistindo de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e poliestireno.

7. Método para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo carreador ser uma partícula de ouro.

8. Método para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo anticorpo secundário ser selecionado de um grupo consistindo de IgG, IgM, IgA, IgE e subclasses deles.

9. Método para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela proteína ser selecionada de um grupo consistindo de Proteína A e Proteína G.

10. Método para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela enzima ser selecionada do grupo consistindo de fosfatase alcalina, peroxidase, β -galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase.

11. Método para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo marcador ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.

12. Método para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo passo de detecção do anticorpo anti-leishmanial ser selecionado do grupo consistindo de detecção de fluorescência, de imunoluminescência, de absorbância ou de radioisótopos.

13. Kit para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, caracterizado por compreender os peptídeos consistindo das sequências SEQ ID N^{os} 1 e 2 associados ou isolados; e um anticorpo secundário ou uma pro-

teína, onde o anticorpo secundário ou a proteína está conjugado a um enzima ou marcador, e um reagente para detectar a dita enzima ou marcador.

14. Kit para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelas proteínas recombinantes ou os peptídeos estarem ligados a uma suporte sólido ou carreador.

15. Kit para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo suporte sólido ser selecionado do grupo de material consistindo de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e polistireno.

16. Kit para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo carreador consistir de partículas de ouro.

17. Kit para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo anticorpo secundário ser selecionado do grupo consistindo de IgG, IgM, IgA, IgE e subclasses deles.

18. Kit para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela proteína ser selecionada do grupo consistindo de proteína A e proteína G.

19. Kit para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo dito marcador ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.

20. Kit para teste imunodiagnóstico de Leishmaniose, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela enzima ser selecionada do grupo compreendendo fosfatase alcalina, peroxidase, β -galactosidase, uréase, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase.

FIGURAS

Peptídeo 47 (4ug)

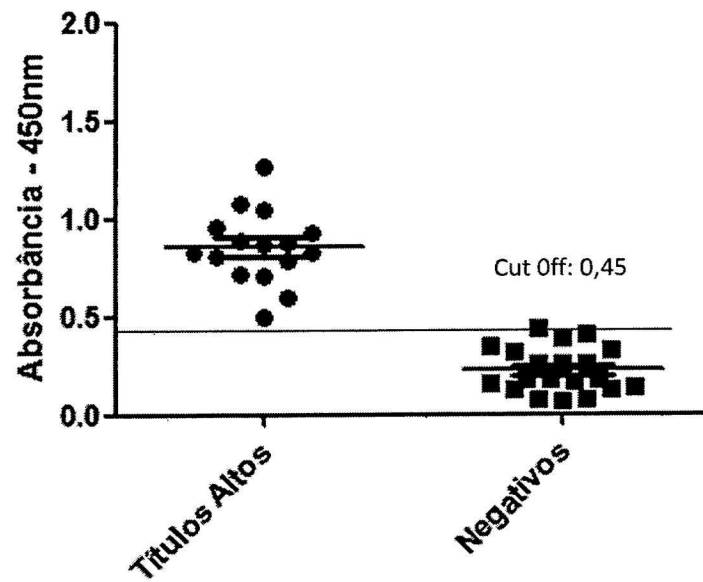


Figura 1

Peptídeo 47 (250ng)

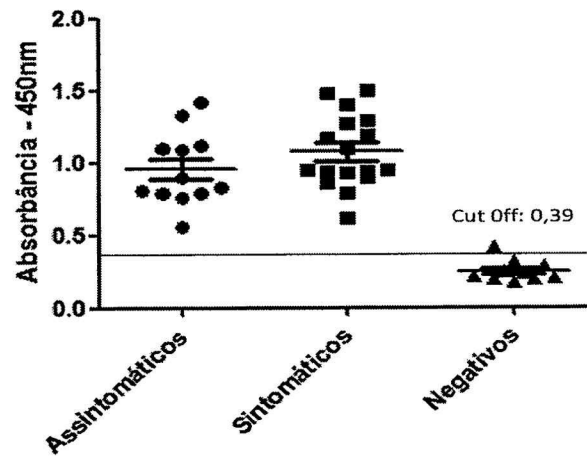


Figura 2

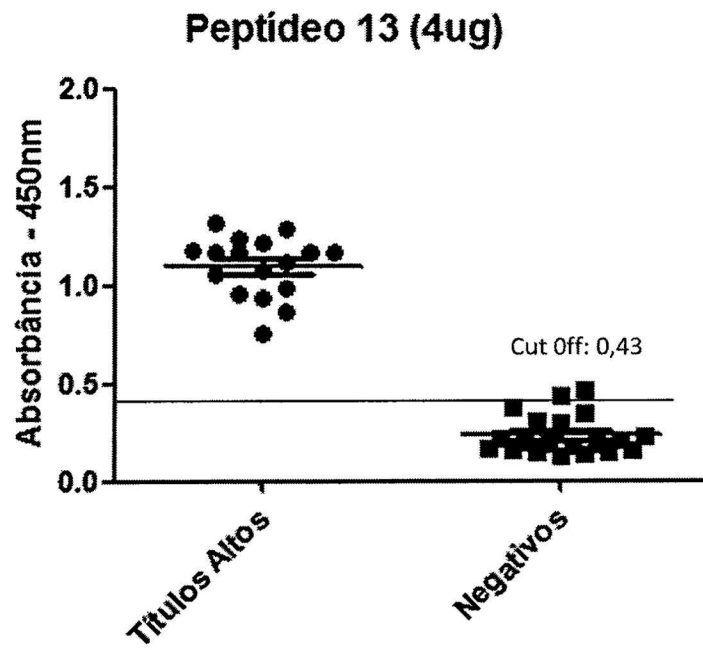


Figura 3

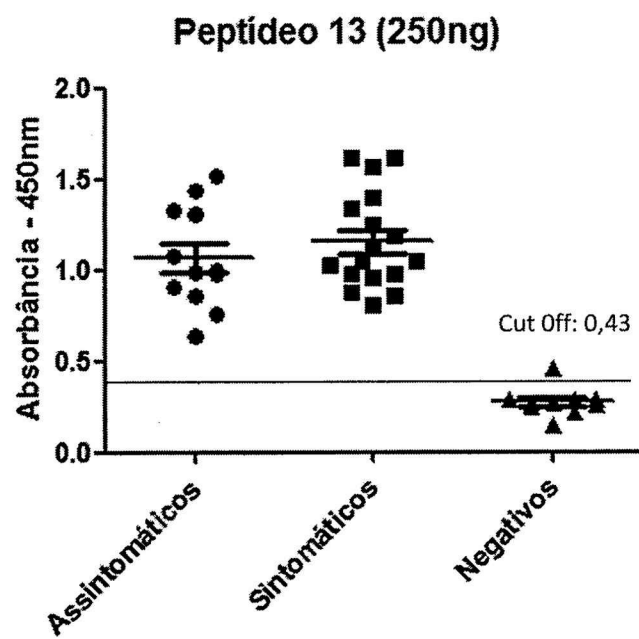


Figura 4

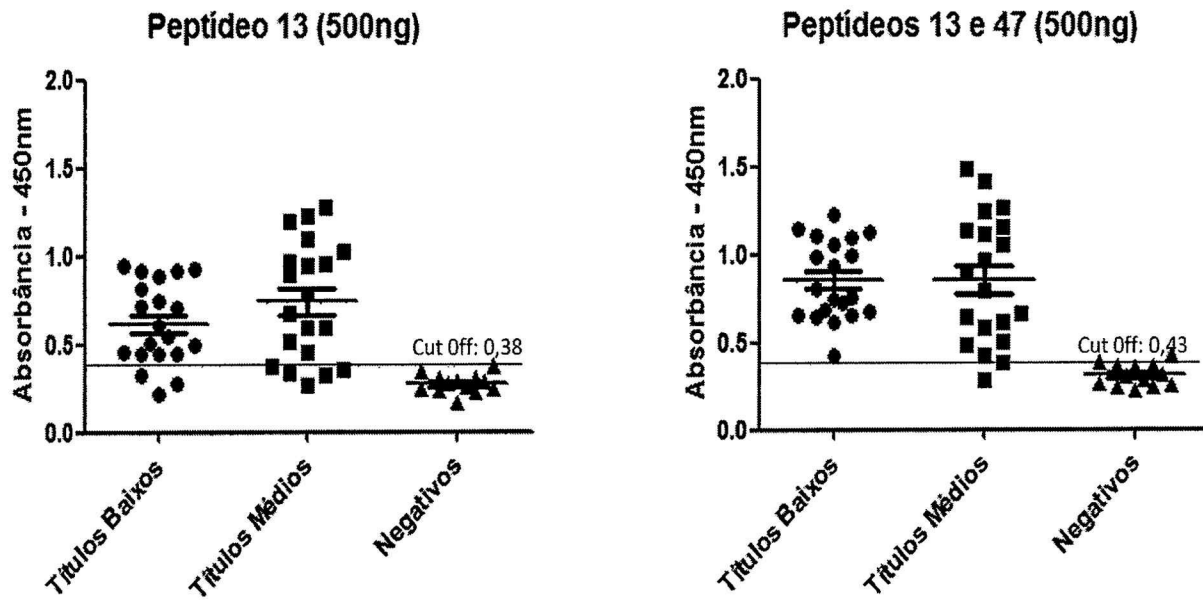


Figura 5

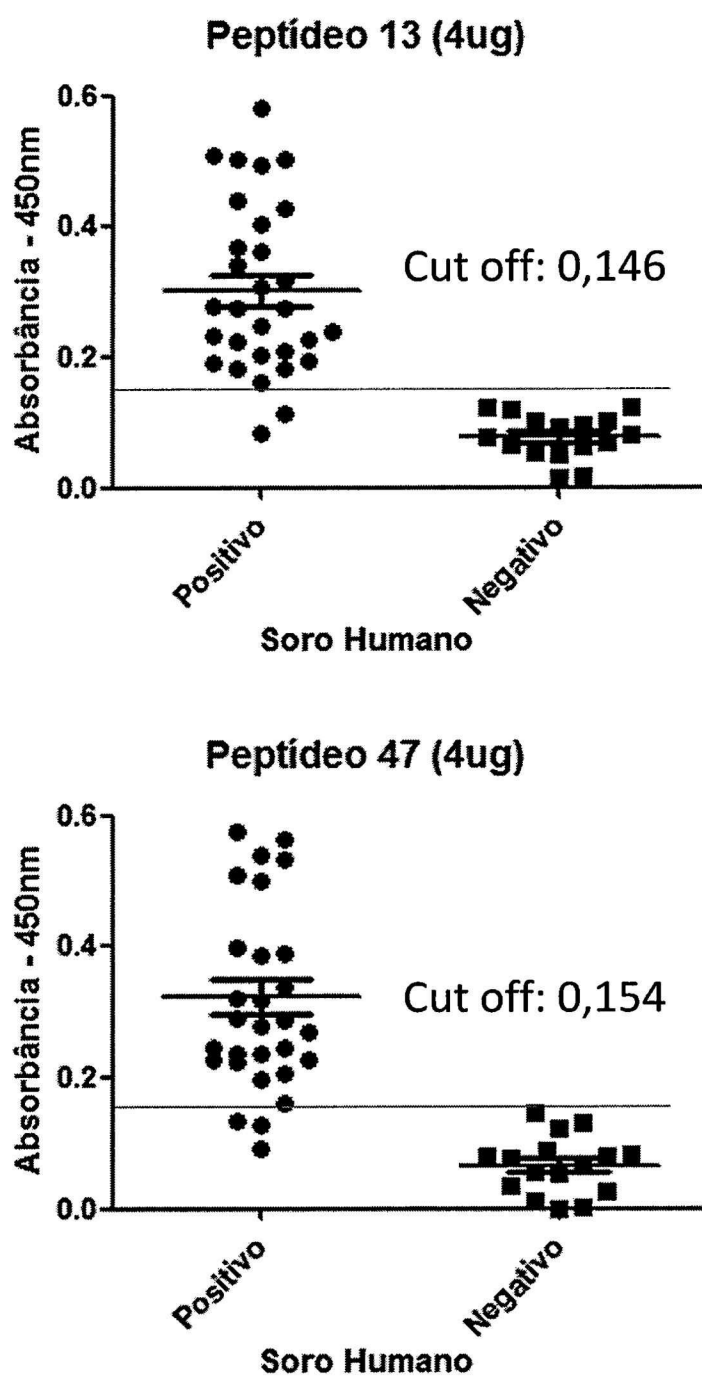


Figura 6

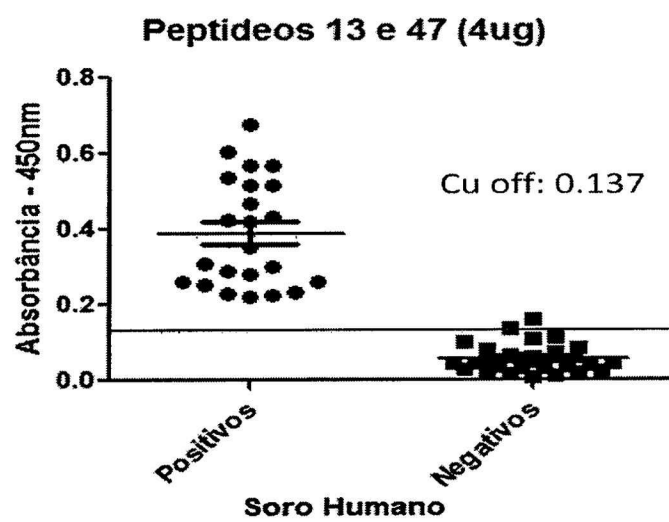


Figura 7