República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020006846-6 A2

(22) Data do Depósito: 03/04/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 07/12/2021

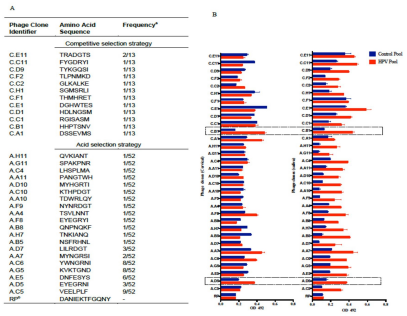
(54) Título: PEPTÍDEOS SINTÉTICOS MIMÉTICOS A PROTEÍNA L1 DO HPV, MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE HPV, SISTEMA DE DIAGNÓSTICO DE HPV, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS MESMOS NO TRATAMENTO OU PROFILAXIA DO HPV

(51) Int. Cl.: C07K 7/08; C07K 14/00; C07K 19/00; A61K 39/12; G01N 33/571; (...).

(71) Depositante(es): IMUNOSCAN ENGENHARIA MOLECULAR LTDA; UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA ? UFU.

(72) Inventor(es): LUIZ RICARDO GOULART FILHO; BRUNA FRANÇA MATIAS COLOMBO; EMÍLIA REZENDE VAZ; ROBINSON SABINO SILVA; JOÃO PEDRO TANNÚS GOULART; MAYARA INGRID DE SOUSA LIMA.

(57) Resumo: PEPTÍDEOS SINTÉTICOS MIMÉTICOS A PROTEÍNA L1 DO HPV, MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE HPV, SISTEMA DE DIAGNÓSTICO DE HPV, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS MESMOS NO TRATAMENTO OU PROFILAXIA DO HPV. A presente invenção refere-se à seleção e caracterização de peptídeos sintéticos, projetados e sintetizados a partir da análise de clones de fagos mimetopos do epítopo imunológico da proteína L1 do papilomavírus humano (HPV). Mais particularmente os peptídeos sintetizados foram imunorreativos e capazes de detectar anticorpos IgA em amostras de fluidos corporais de pacientes com HPV, podendo ser utilizados no diagnóstico do HPV. Além disso, os peptídeos sintetizados foram capazes de provocar resposta imune in vivo. Particularmente a presente inveção refere-se à seleção, caracterização e utilização desses novos peptídeos sintetizados tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento e/ou profilaxia do HPV. Além disso, a presente invenção ainda descreve um método de diagnóstico de HPV e uma composição farmacêutica compreendendo ao menos um destes novos peptídeos sintetizados e o uso destes peptídeos para preparar medicamentos ou composições imunogências para o tratamento e/ou profilaxia de HPV.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção: **"PEPTÍDEOS SINTÉTICOS MIMÉTICO A PROTEÍNA L1 DO HPV, MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE HPV, SISTEMA DE DIAGNÓSTICO DE HPV, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS MESMOS NO TRATAMENTO OU PROFILAXIA DO HPV".**

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se à seleção e caracterização de peptídeos sintéticos, projetados e sintetizados a partir da análise de clones de fagos mimetopos do epítopo imunológico da proteína L1 do papilomavírus humano (HPV). Mais particularmente os peptídeos sintetizados foram imunorreativos e capazes de detectar anticorpos IgA em amostras de fluidos corporais de pacientes com HPV. Além disso, os peptídeos sintetizados foram capazes de provocar resposta imune *in vivo*. Particularmente a presente inveção refere-se à seleção, caracterização e utilização desses novos peptídeos sintetizados. Além disso, a presente invenção ainda descreve um método de diagnóstico de HPV, um sistema de diagnóstico de HPV por detecção eletroquímica e uma composição farmacêutica compreendendo ao menos um destes novos peptídeos sintetizados e o uso destes peptídeos para preparar medicamentos ou composições imunogências para o tratamento e/ou profilaxia de HPV.

Fundamentos da Invenção

[002] A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é a

doença viral sexualmente transmissível mais comum e representa um grande problema de saúde pública mundial, devido a sua alta incidência e forte associação com malignidades. Mais de 100 tipos de HPV foram identificados e aproximadamente metade deles apresenta alto tropismo para células epiteliais e membranas mucosas, onde podem causar lesões benignas, câncer ou persistir de forma assintomática.

[003] Globalmente, o principal método de detecção de HPV ainda é o teste de Papanicolaou, porque muitos países com poucos recursos não possuem a infraestrutura técnica e programas de saúde pública para oferecer testes de suporte. Embora o exame de Papanicolaou diminua a incidência de câncer cervical (também conhecido como câncer de colo de útero) e a taxa de mortalidade, sua detecção limita-se às habilidades do observador para reconhecer e classificar uma variedade de anormalidades celulares, quando avaliadas isoladamente, pode resultar comumente em resultados indeterminados ou falso-negativos. O exame de Papanicolau, guiadas ou não por biópsia, pode ser invasivo e desconfortável. Atualmente, os métodos moleculares para detecção de HPV assumem um papel de grande importância no cenário de diagnóstico precoce do HPV e prevenção do câncer cervical e oferecem alternativas promissoras como ferramentas de triagem para melhorar a sensibilidade da citologia convencional [(MOLIJN A., et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV)

infections. J. Clin. Virol. **2005**. p. 43-51); (GUTIÉRREZ-XICOTÉNCATL L., et al., Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. Salud Publica Mex. 2009. p. s479-s488); (ARNEY A., BENNETT K.M. Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus. Lab. Med. 2010. p. 523-530); (ZARAVINOS A., et al., Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). Int J Biol Markers. 2009; 24(4):215-222)].

[004] Dentre as técnicas moleculares disponíveis, à amplificação do DNA viral através do PCR e os métodos de hibridização são descritos em vários documentos e estão disponível em vários kits de diagnóstico já comercializados (por exemplo, kit Cobas® HPV test; Linear Array® HPV genotyping test; dentre outros). Alguns exemplos de pedidos de patente que descrevem métodos de diagnóstico para o HPV e utilizam como técnica o PCR são os documentos BR 102016003502-3; BR 102017018274-6; US 2019/0153552; WO 2015026827.

[005] Apesar da grande quantidade de opções disponíveis para o diagnóstico do HPV, ainda sim se observa uma necessidade de se dispor de métodos de diagnóstico com custos mais acessíveis, simples, rápidos, menos invasivos, de alta eficácia, confiabilidade e que possam detectar a presença do agente o mais precocemente possível, uma vez que a infecção por HPV é de progressão lenta e pode ainda contar com falsos-

negativos com uso somente do exame de Papanicolau. Estudos mostram que cerca de 63% dos pacientes com HPV-DNA positivo podem ser falsamente tranquilizados como um resultado negativo quando são rastreados usando apenas o teste de Papanicolaou. Além disso, todos esses pacientes tem história prévia de infecção pelo HPV, mas ainda não haviam eliminado a carga viral, e resultados falso-negativos podem afetar diretamente a conduta médica. Além disso, os resultados classificados como células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) foram 100% positivos na detecção do HPV-DNA. Estes estudos reforçam a importância de implementar novas abordagens para a detecção do HPV como co-teste comparador de achados citológicos.

[006] Recentemente, a saliva têm sido freqüentemente usada como fluido biológico em diagnósticos de doenças devido à sua coleta fácil e não invasiva. Vários estudos utilizaram amostras salivares para detecção de anticorpos em diversos diagnósticos de doenças [(CUEVAS-CÓRDOBA, B., SANTIAGO-GARCÍA, J., Saliva: a fluid of study for OMICS. OMICS. 2014; 18(2):87–97); (MALAMUD, D., Saliva as a Diagnostic Fluid. Dent. Clin. North Am. 2011. p. 159–178)]. De fato, a saliva oferece vantagens características sobre o soro e outros fluidos corporais e pode fornecer uma abordagem custo-efetiva para grandes exames populacionais.

[007] Realizamos uma abordagem adicional em fluidos

orais para propor um método rápido e minimamente invasivo para a detecção do HPV, como simples apoio ao diagnóstico de achados citológicos. Para tanto, os valores de IgA das amostras cervicais e de saliva foram avaliados pela correlação de Spearman. Houve correlação positiva significativa ($r = 0,59$; $p < 0,0001$) entre as respostas de IgA presente nas amostras cervicais e na saliva, sugerindo que dentro de compartimentos mucosos distintos pode haver alguma comunicação. Cameron et al. testaram IgG contra as cápsides de HPV-6, HPV-11 e HPV-16 em amostras orais e séricas, com correlação exata entre TMO (transudato da mucosa oral) e soro (Cameron J.E., et al. Human papillomavirus-specific antibody status in oral fluids modestly reflects serum status in human immunodeficiency virus-positive individuals. Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10(3):431–43), corroborando com nossos resultados.

[008] A história natural da resposta imune oral do HPV não é clara [(Gaester K., et al. Human papillomavirus infection in oral fluids of HIV-1-positive men:prevalence and risk factors. Sci Rep. 2014; 4:6592); (Videla S, Darwich L, Canadas M. Natural History of Human Papillomavirus Infections Involving Anal, Penile, and Oral Sites Among HIV-Positive Men. Sex Transm. 2013; 40(1):3–10)] e a associação salivar com a resposta imune sistêmica ainda não foi bem explorada. Até agora, poucos estudos foram relatados sobre

a resposta sistêmica de anticorpos IgA ao HPV. Passmore et al. encontraram mais respostas de IgA específicas para HPV-16 na cavidade oral em relação às respostas cervicais e séricas, no entanto, apenas 1% das mulheres testadas tinham DNA detectável de HPV-16 nos compartimentos salivares (Passmore J-AS, et al. Cervicovaginal, oral, and serum IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 in women with cervical intraepithelial neoplasia. J Med Virol. 2007; 79(9):1375–1380). Por outro lado, Golçalves et al. avaliaram títulos de IgA secretora na saliva de mulheres com orofaringe e HPV genital e concluíram que pacientes com DNA de HPV na orofaringe tinham títulos de IgA extremamente baixos quando comparados a mulheres HPV negativas em amostras de saliva (Gonçalves AKS, et al. Secretory immunoglobulin a in saliva of women with oral and genital HPV infection. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006; 124(2):227–231). De fato, estudos sobre a comunicação entre os compartimentos mucosos na biologia da resposta imune sistêmica ainda são necessários.

[009] Desta forma, a busca do diagnóstico molecular é o de gerar marcadores mais baratos, estáveis e de alta sensibilidade para detecção de proteínas alvo em fluídos corporais como a saliva. Em uma das modalidades aqui descritas, propomos novos peptídeos sintetizados para uso em um método de diagnóstico molecular do HPV baseado na detecção de anticorpos IgA apartir de amostras de saliva ou amostras

de fluído cervical, com alto potencial de suporte ao exame de Papanicolaou na triagem populacional.

[010] O genoma do HPV tem aproximadamente 8.000 pb, dividido em três regiões, uma região controle longa não codificante (LCR) que contém a origem da replicação viral do DNA e os elementos enhancer/promoter que regulam a transcrição viral; as outras duas regiões codificantes incluem proteínas precoces (E) e tardias (L). A região precoce está envolvida na replicação viral e na oncogênese, e codifica seis quadros de leitura aberta (ORFs) E1, E2, E4, E5, E6 e E7. A região tardia codifica as proteínas estruturais L1 e L2 para o capsídeo viral. Nas últimas décadas, essas proteínas tem sido usadas como alvo para produção de vacinas para uso no tratamento ou profilático da HPV. Por exemplo, o pedido de patente WO2018085751 descreve peptídeos compreendendo as sequências de amino ácidos das proteínas E6 e E7 do HPV. A proteína L1 do HPV tem sido um alvo também muito atrativo para a produção de vacinas devido à sua capacidade de auto-montagem, que permite a formação de partículas semelhantes a vírus (VLPs) contendo epitopos altamente imunogênicos. Por exemplo, o pedido de patente BR 112017004181-2 descreve uma vacina compreendendo amino ácidos da proteína L1 do HPV. Além disso, a sequência de DNA da proteína L1 é quase 80-90% idêntica a diferentes tipos virais, tornando-se um poderoso candidato a abordagens

diagnósticas [(BUCK C.B., et al. The papillomavirus major capsid protein L1. Virology. 2013; 445(1-2):169-17); (COUTLÉE F., et al. Use of PGMY Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples Use of PGMY Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. 2002; 40(3):902-907])].

[011] Recentemente a indústria farmacêutica disponibilizou duas vacinas profiláticas no mercado, uma vacina bivalente Cervarix® e uma vacina quadrivalente Gardasil®, que fornecem forte proteção de anticorpos neutralizantes contra dois vírus de alto risco (HPV-16 e HPV-18), que estão associados com cerca de 70% dos casos de câncer cervical (SMITH J.S., 2007. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. Int J Cance 7 121:621–632), mas em grande parte não protegem contra outros tipos virais que estão também envolvidos na carcinogênese (SCHILLER, J.T., et al. 2012. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. Vaccine 30 (Suppl 5):F123-38). As vacinas profiláticas são produzidas a partir de VLP (Virus Like-Particles) contendo a proteína principal do capsídio viral (L1), capaz de gerar resposta baseada em anticorpos neutralizantes tipo-específicos e capaz de gerar resposta

baseada em anticorpos neutralizantes tipo-específicos e prevenir a infecção pelo HPV.

[012] Atualmente, muitos estudos têm sido direcionados no sentido de oferecer uma opção profilática que abranja vários tipos de HPV de alto risco em uma única formulação vacinal, como uma eficiente alternativa de prevenção do câncer cervical, bem como de outros tumores HPV-associados.

[013] O desenvolvimento de uma vacina baseada no vírus morto ou atenuado é limitada pela falta de sistemas de cultura de tecidos para propagação viral. Uma atrativa opção no desenvolvimento de vacinas profiláticas é a utilização de epítopos conservados das proteínas da cápside viral (L1 ou L2) que sejam capazes de desenvolver anticorpos de neutralização cruzada a diferentes tipos de HPV, visto que as vacinas atuais podem futuramente selecionar outros tipos virais considerados de baixa dominância.

[014] Uma interessante ferramenta para descoberta de peptídeos recombinantes com aplicações biotecnológicas tem sido a metodologia de Phage Display (PD). Esta técnica baseia-se na inserção de um gene ou fragmento de gene em bacteriófagos, resultando na expressão de peptídeos aleatórios com especificidade ao alvo de interesse [(Barbas CF. 1993. Recent advances in phage display. Curr Opin Biotechnol); (Smith GP, Petrenko V a. 1997. Phage Display. Chem Rev 97:391–410)].

[015] A exibição em fagos tem sido utilizada para identificar sequências com aplicação no diagnóstico de doenças ([(Hairul Bahara N.H., et al. 2013. Phage display antibodies for diagnostic applications. Biologicals. 2013 Jul;41(4):209-16); (Rakonjac J., et al. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. Curr Issues Mol Biol 13:51-76)], bem como no desenvolvimento de vacinas (Gao J., et al. Phage display and its application in vaccine design. Ann Microbiol 2010, 60:13-19).

Objetivo da invenção

[016] O presente pedido de patente teve como objetivo identificar e sintetizar novos peptídeos miméticos para a proteína L1 do HPV, que tivessem capacidade melhorada de serem usados em um método de diagnóstico do HPV, bem como na produção de composições farmacêuticas para tratamento ou preveção do HPV.

Breve descrição da invenção

[017] O presente pedido de patente descreve seis (6) novos peptídeos sintéticos que foram projetados e sintetizados após análise *in vitro* de clones de fagos obtidos por Phage Display e que apresentaram ser potentes mimetópos do epítopo imunológico da proteína L1 do papilomavírus humano (HPV).

[018] Os seis (6) peptídeos foram produzidos

quimicamente com uma amidação na região C-terminal e conjugados à Albumina de Soro Bovino (BSA) à cisteína N-terminal, incluindo um espaçador (GGGS). Em três peptídeos (PEP1, PEP3 e PEP4), adicionou-se parte da sequência da proteína pIII do bacteriófago (AETVESCL). Essas estratégias foram adotas para aumentar a sensibilidade e imunogenicidade em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

[019] Em outra modalidade aqui descrita, tais peptídeos apresentaram capacidade de serem reconhecidos por IgA específica para HPV em fluídos corporais. Portanto, se descreve o uso destes peptídeos em um método de diagnóstico de HPV, bem como o referído método de diagnóstico em si. Também em outra modalidade se descreve um Kit para ser usado em um método de diagnóstico, bem como um um sistema de detação utilizando um bioeletrodo.

[020] Uma outra modalidade aqui descrito, tais preptídeos apresentaram capacidade de induzirem resposta imunológica contra o HPV. Desta forma se descrevem composições farmacêuticas para uso no tratamento e/ou profilaxia do HPV que compreendem ao menos um dos novos peptídeos sintetizados aqui descritos, mais, pelo menos, um veículo, carreador e/ou composto farmacêuticamente aceitável.

[021] Outra modalidade aqui descrita é o uso dos novos peptídeos sintéticos ou das composições farmacêuticas aqui

descritas, para a preparação de um medicamento ou composição imunogênica para uso no tratamento e/ou profilaxia do HPV.

[022] Outras modalidades aqui descritas são: um método de tratamento e/ou profilático do HPV, bem como um Kit para ser usado em um método de diagnóstico, tratamento e/ou profilático do HPV.

[023] **Breve descrição das figuras**

[024] A presente invenção será melhor compreendida com base na descrição, a seguir, tomada em conjunto com as figuras anexas, nas quais:

[025] A FIGURA 1A mostra as sequências de aminoácidos de todos os mimotopos selecionados por Phage Display e suas frequências.

[026] A FIGURA 1B mostra a reatividade de ensaios ELISA para os mimotopos com amostras cervicais e salivares de pacientes com HPV (pool) e controles saudáveis (pool).

[027] A FIGURA 2A mostra o alinhamentos múltiplos da sequência deduzida do fago C.B1 com as sequências de diversos tipos de HPV da proteína L1 (HPV06, 11, 16, 18, 33, 45 e 31).

[028] A FIGURA 2B mostra as regiões da proteína L1 do HPV com provável antigenicidade e o emparelhamento com uma região da proteína L1 de HPV16.

[029] A FIGURA 2C mostra a estrutura cristalográfica tridimensional da proteína L1 do HPV (PDB: 2R5H).

[030] A FIGURA 2D-E mostram um modelo tridimensional da estrutura predita para a proteína L1 e localização do provável epítopo.

[031] A FIGURA 2F mostra a escala de predição de imunogenicidade na estrutura 3D para a proteína L1.

[032] A FIGURA 3A mostra a detecção de anticorpo IgA específico em amostras cervicais de pacientes infectados com HPV e de indivíduos controles não-infectados.

[033] A FIGURA 3B mostra a detecção de anticorpo IgA específico em amostras salivares de pacientes infectados com HPV e de indivíduos controles não-infectados.

[034] A FIGURA 3C mostra a curva ROC de amostras cervicais (C).

[035] A FIGURA 3D mostra a curva ROC de amostras salivares (D).

[036] As FIGURAS 4A-D mostram a detecção de Imunoglobulina A pelo mimotopo C.B1 de acordo com a classificação genotípica de risco por Nested-Multiplex PCR (nmPCR) e cytologia (Papanicolau).

[037] A FIGURA 5A mostra a titulação do fago C.B1 para detecção de IgA, IgG e IgM.

[038] A FIGURA 5A mostra mostra a titulação do fago C.B1 para correlação entre os fluidos cervical e salivar.

[039] A FIGURA 6A mostra o alinhamento do PEP1 na estrutura tridimensional da proteína principal do capsídeo

(L1) do HPV-16 (PDB: 2R5H).

[040] A FIGURA 6B mostra o alinhamento do PEP3 na estrutura tridimensional da proteína principal do capsídeo (L1) do HPV-16 (PDB: 2R5H).

[041] A FIGURA 6C mostra o alinhamento do PEP4 na estrutura tridimensional da proteína principal do capsídeo (L1) do HPV-16 (PDB: 2R5H).

[042] A FIGURA 7A mostra o reconhecimento da IgA pelos peptídeos sintetizados em membrana de nitrocelulose (Slot-blot) de um pool de amostras cervical e salivar.

[043] A FIGURA 7B mostra uma curva eletroquímica de voltametria cíclica em eletrodo de grafite modificado.

[044] A FIGURA 7C mostra a densidade de carga (carga/C) dos pools salivares negativos (controle) e positivos para HPV.

[045] A FIGURA 8 mostra uma representação esquemática do formato do bioeletrodo usado na detecção eletroquímica.

[046] A FIGURA 9A mostra a viabilidade celular da linhagem de macrófago murino (J774A-1) sob estímulo do peptídeo 1.

[047] A FIGURA 9B mostra a viabilidade celular da linhagem de macrófago murino (J774A-1) sob estímulo do peptídeo 2.

[048] A FIGURA 9C mostra a viabilidade celular da linhagem de macrófago murino (J774A-1) sob estímulo do

peptídeo 3.

[049] A FIGURA 9D mostra a viabilidade celular da linhagem de macrófago murino (J774A-1) sob estímulo do peptídeo 4.

[050] As FIGURAS 10A-D mostram os perfis da produção de anticorpos IgG em amostras de soro murino, por ELISA, para avaliação da imunização com os peptídeos sintetizados.

[051] As FIGURAS 11A-D mostram as titulações de anticorpos IgA presentes em mucosa vaginal murina, por ELISA, para avaliação da imunização com os peptídeos sintetizados.

[052] As FIGURAS 11E-F mostram os níveis gerais da expressão de IgA representado por gráficos lineares, de acordo com a média e desvio padrão da produção de anticorpos entre a primeira e última imunização para os respectivos peptídeos sintetizados.

[053] As FIGURAS 12 mostram os perfis de resposta imune celular de esplenócitos murinos obtidos de animais imunizados com vascinas compreendendo os peptídeos sintizados.

Descrição detalhada da invenção

[054] O presente pedido de patente descreve seis (6) novos peptídeos sintéticos projetados e sintetizados após análise *in vitro* de clones de fagos obtidos por Phage Display e que apresentaram ser potentes mimetópos do epítopo imunológico da proteína L1 do papilomavírus humano (HPV).

Seleção dos clones de fagos – mimético do epítopo de L1

[055] Para seleção de mimetopos utilizou-se o kit de bibliotecas de peptídeos Ph.D.-C7C Phage Display (PD) (New England Biolabs, Ipswich, EUA) baseado numa biblioteca combinada de peptídeos aleatórios fundida com a capsideo da proteína pIII do fago M13. A biblioteca Ph.D.-C7C foi submetida a seleções negativas e positivas contra IgAs purificadas de um pool de indivíduos dos Grupos 1 (individuos saudáveis), 2 (pacientes com outras doenças genitais) e 3 (pacientes com diagnóstico definitivo de infecção por HPV). Para bioprospecção, foram utilizados 10µL ($1x10^{11}$ fagos) da biblioteca Ph.D.-C7C diluída em 190 µL 0,1% de TBS-T. A seleção dos ciclos foi realizada utilizando 20 µL de esferas ligantes a IgAs purificadas de cada grupo. Para seleção negativa, a biblioteca foi incubada com esferas magnéticas acopladas a IgA de individuos saudáveis (Grupo 1) durante 30 minutos, com agitação em temperatura ambiente. Então, o sobrenadante com fagos não ligados foi incubado a IgA-beads de pacientes com outras doenças genitais (Grupo 2) por 30 min à temperatura ambiente, com agitação. Após este segundo passo de subtração, foi efetuada uma seleção positiva utilizando fagos não ligados que foram incubados com IgA-bead de pacientes com diagnóstico definitivo de infecção por HPV (Grupo 3) nas mesmas condições. O processo de seleção subtrativa foi repetido 3 vezes no pool de IgA do grupo 1 e

duas vezes no grupo 2, a fim de aumentar a especificidade dos fagos para o alvo. Duas estratégias para a eluição de fagos específicos foram adotadas. Uma delas foi adicionado a uma solução de pH ácido (0,2 M Glicina, pH 2,2) e neutralizado com Tris (1M , pH 9.1), seguido de 3 ciclos de seleção idêntica. Outra estratégia foi definida por eluição competitiva, utilizando a vacina quadrivalente contra o HPV (Gardasil®), que contém partículas semelhantes a vírus (VLPs) de uma região antigênica do vírus (proteína L1 HPV 06, 11, 16 e 18), seguida de 2 ciclos seleção. Os fagos eluídos foram amplificados em E. coli (ER2738) (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), purificados utilizando precipitação com polietilenoglicol 8.000 e NaCl 2,5 M a 20% (p/vol) após cada ciclo de biopanning. Colônias bacterianas individuais contendo clones de fagos amplificados foram cultivadas em uma placa de microtitulação e tituladas de acordo com o método descrito por Barbas et al. (Barbas C.F., et al. Phage display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Raven Press, 2001).

[056] Um total de 65 clones foram selecionados aleatoriamente, 13 obtidos por estratégia de seleção competitiva e 52 por meio de eluição ácida, usando uma biblioteca de peptídeos aleatórios expressos em fagos. A partir de 65 clones de fagos selecionados, 32 possíveis mimetopos apresentaram diferentes seqüências (12 por eluição

competitiva e 20 em seleção ácida) (Figura 1A). Os fagos selecionados mostraram diferentes reatividades quando testados contra amostras cervicais e de saliva por ELISA (Figura 1B); dois clones obtiveram maior proporção de absorbância entre o pool positivo e negativo para o HPV no fluido cervical e salivar. O fago C.B1 apresentou uma proporção de 3,09 no conjunto cervical e 3,45 no conjunto salivar, enquanto que o fago A.D5 apresentou uma proporção de 1,93 e 2,44 em ambas as amostras, respectivamente. O pool positivo de HPV em ambos os clones resultou em diferenças significativas ($p < 0,0001$) nos dois fluidos quando comparado com o fago (RP) (SEQ ID N°07) e o grupo de controle (Two-way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Tukey). Devido à maior reatividade do fago C.B1 em comparação com os outros clones de fagos, vamos demonstrar, como exemplo aqui, os resultados das investigações adicionais que foram realizadas com este clone.

Sequenciamento de DNA e Análise bioinformática

[057] Após três ciclos de seleção e eluição com ácido e duas rodadas de eluição competitiva, os DNAs de cadeia simples dos fagos foram isolados pelo procedimento de extração com tampão iodado (Azzazy H.M.E., Highsmith W.E. Phage display technology: Clinical applications and recent innovations. Clin. Biochem. 2002. p. 425-445). A eletroforese foi realizada em gel de 0,8% corado com solução

de brometo de etídio, a fim de verificar a qualidade do DNA. A sequência nucleotídica da inserção do gene III foi sequenciada usando o Kit de Sequenciamento de Ciclos DyEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare, Pittsburg, PA, EUA), com o primer -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3 ') SEQ ID N°08, de acordo com as instruções do fabricante, e detectadas em um sequenciador capilar automático MegaBace 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, USA). A sequência de aminoácidos da sequência nucleotídica foi predita usando o software ExPASy disponível on-line (http://www.expasy.org). O alinhamento entre as sequências foi realizado usando o programa ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/), e a similar-dade com proteínas do HPV foi verificada usando a pesquisa BLASTp (http: // www. ncbi.nlm.nih.gov/blast). A estrutura tridimensional do HPV16 L1 foi obtida do Banco de Dados de Proteína (PDB: 2R5H) (Bishop B., et al. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: Understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. J Biol Chem. 2007; 282(43):31803-31811) e a análise de similaridade foi predita usando o Pepitope Server (Mayrose I., et al. Pepitope: Epitope mapping from affinity-selected peptides. Bioinformatics. 2007; 23(23):3244-3246). O grau de antigenicidade da proteína L1HPV16 foi calculado para toda a sua estrutura tridimensional pelo programa Epitopia Server

(http://epitopia.tau.ac.il/) (Rubinstein N.D., et al. Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitopes. BMC Bioinformatics. 2009; 10:287). A predição de epitopo de anticorpo da proteína L1HPV16 foi realizada utilizando a escala de antigenicidade de Predição de Epitopo Linear Bepipred (Larsen J.E.P., et al. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res. 2006; 2:2).

[058] O alinhamento linear com a sequência de aminoácidos do fago C.B1 foi cruzado com proteínas distintas do HPV nos estudos realizados (dados não mostrados) e mostrou até seis (85,7%) resíduos conservados ou semi-conservados de aminoácidos a uma proteína imunogênica de diferentes tipos de HPV (tipos: 06, 11, 16, 18, 31, 33 e 45), a principal proteína L1 do capsídeo do HPV (Figura 2A). Resíduos conservados (*) e semi-conservados estão marcados em cinza na figura 2A. Cinco (71,4%) resíduos de aminoácidos do fago C.B1 foram emparelhados com uma região da proteína L1 de HPV16 (Figura 2B). As predições de antigenicidade foram feitas pelo software *Bepipred linear epitope prediction scale*. O cut-off (*Threshold*) de 0,35; média (0,03); antigenicidade mínima (-2,684); antigenicidade máxima (1,557). Regiões com provável antigenicidade na escala acima de 0,35 são consideradas antigênicas. O tamanho da janela e posição central foram respectivamente 7 e 4. *Localização estrutural do C.B1 na proteína do capsídeo L1 (resíduos de

194 a 200) do HPV16 (Figura 2A).

[059] Análises tridimensionais da sequência do mimetopo foram previstas adicionando uma sequência espaçadora (GGGS) e aminoácidos (alanina e cisteína) responsáveis pela conformação do peptídeo da biblioteca de peptídeos. Este aminoácido adicional (ACxxxxxxxCGGGS) foi usado para que a exposição ao alinhamento se torne mais específica para o reconhecimento do alvo. A estrutura cristalografada da proteína L1 de HPV16 (PDB: 2R5H) (Figura 2C) foi utilizada para representar o alinhamento com C.B1 (Figuras 2D-E). As figuras 2D e 2E mostram um modelo 3D da estrutura predita para a proteína L1 e localização do provável epítopo. Em vermelho encontra-se a região mimética do peptídeo sintetizado a partir do clone de fago C.B1: SEQ ID N°05 (PEP-C.B1). Embora os resultados dos testes adicionais utilizando o clone de fago C.B1não tenham sido demonstrados aqui, sintetizamos também a região mimética ao L1 de HPV do clone de fago A.D5: SEQ ID N°06 (PEP-A.D5).

[060] O mapeamento dos epítopos revelou regiões antigênicas e apresentou diferentes graus de imunogenicidade, os quais são representados em sua estrutura tridimensional (Figura 2F). A escala de predição de imunogenicidade na estrutura 3D para a proteína L1 foi realizada pelo Epitopia Server.

Design e síntese dos novos peptídeos

[061] Após a bioinformática e a análise in vitro dos clones de fagos e dos peptídeos sintetizados a partir dos clones dos fagos C.B1 e A.D5 (PEP-C.B1 e PEP-A.D5) como potentes miméticos para detecção de HPV, quatro novas sequências peptídicas foram projetadas e sintetizadas quimicamente. As seqüências foram sintetizadas com amidação da região C-terminal e conjugação da Albumina de Soro Bovino (BSA) a cisteína na região N-terminal, incluindo um espaçador (GGGS) e sequência da proteína pIII do fago (AETVESCL) como estratégia para aumentar a sensibilidade e imunogenicidade.

[062] Foram selecionados os dois mimetopos que apresentaram à maior reatividade para a síntese dos peptídeos (C.B1 e A.D5) (em destaque nas sequências) gerando 4 novas sequencias. O peptídeo 1 (PEP1) foi originado do clone de fago C.B1: ACHHPTSNVCGGGSAETVESCL (SEQ ID N°01). O peptídeo 2 (PEP2) foi gerado a partir de duas repetições da sequência do clone C.B1: ACHHPTSNVCGGGSACHHPTSNVC (SEQ ID N°02). O terceiro peptídeo (PEP3) foi construído de forma quimérica, a partir das sequências dos clones C.B1 e A.D5 (ACHHPTSNVCGGGSA CEYEGRNICGGGSAETVESCL (SEQ ID N°03); enquanto que o quarto peptídeo sintetizado (PEP4) foi originado do fago A.D5: ACEYEGRNICGGGSAETVESCL (SEQ ID N°04).

Análise de Bioinformática dos novos peptídeos

[063] Os peptídeos PEP1, PEP2, PEP3 e PEP4 foram

submetidos a análises in silico. Os estudos prévios indicaram uma maior similaridade das sequências sintetizadas com regiões de epítopo da proteína L1 do HPV (dados não mostrados) sendo, portanto, a proteína escolhida para as predições estruturais (3D). A representação da estrutura tridimensional com a proteína L1 do HPV foi predita em uma das cadeias da proteína, contudo o capsídeo viral é composto por 5 cadeias idênticas, formando uma estrutura circular pentamérica.

[064] Através de ferramentas de bioinformática deduzimos as regiões miméticas de três dos novos peptídeos sintetizados, PEP1, PEP3 e PEP4, e a proteína L1 do HPV-16 (Figura 6A–C). Interessantemente, o peptídeo quimérico PEP3 (Figura 6B) apresentou maior cobertura à proteína L1 em regiões sabidamente imunogênicas, indicando grande potencial em gerar resposta imune semelhante à proteína nativa do HPV-16. As regiões de localização mimética dos peptídeos estão representadas por esferas coloridas na Figuras 6A-C.

EXEMPLO 1: Avaliação dos novos peptídeos projetados e sintetizados a partir do fago C.B1 como um peptídeo mimético de epítopo potencial para o diagnóstico de HPV

[065] Como exemplo, o novo peptídeo projetado e sintizado a partir do fago C.B1 (PEP1) foi testado por ensaio ELISA utilizando amostras individuais de secreção cervical e saliva. No total, 95,6% (44/46) das amostras cervicais

positivas para HPV e 96,3% (26/27) das amostras de saliva foram positivas para anti-IgA pelo PEP1. O peptídeo PEP1 projetado e sintetizado a partir do fago C.B1 foi capaz de discriminar eficientemente pacientes com HPV e controles (p <0,0001) e RP testados (p <0,0001), em ambos os fluidos (Figuras 3A-B). A curva ROC (*Receiver Operator Charactheristic*) foi significativa em amostras cervicais (p <0,0001; AUC = 0,9145) e saliva (p <0,0001; AUC = 0,9364). O ponto de corte foi determinado de acordo com os maiores valores de sensibilidade e especificidade obtidos pela curva ROC (Figuras 3C-D). Para avaliar o desempenho diagnóstico do referido peptídeo PEP1 foram calculados os valores de odds ratio, razão de verossimilhança positiva (PLR), razão de verossimilhança negativa (NLR), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) (Tabela 1). O odds ratio diagnóstico nas amostras cervicais e de saliva foi de 9,93 e 10,21 e os valores de P associados foram significativamente iguais a 0,003 e 0,031, respectivamente. Em comparação com o diagnóstico para a detecção do HPV por PCR, considerado "padrão ouro", em amostras cervicais, o peptídeo PEP1 mostrou 95,65% de sensibilidade para detectar pacientes HPV, 71,11% de especificidade, 77,19% de PPV, 94,12% de NPV, 3,31 de PLR e 0,06 de NLR. Em amostras de saliva, o peptídeo PEP1 foi capaz de detectar pacientes HPV positivos com sensibilidade de 96,3%, a especificidade de

71,79%, 70,27% de PPV, NPV de 96,55%, PLR de 3,41 e 0,05 de NLR.

[066] **Tabela 1:** Desempenho diagnóstico da avaliação imunológica pelo peptídeo mimotopo PEP1 na saliva e no fluido cervical comparados ao teste com a nested-multiplex PCR.

Fluídos	Odds Ratio	95% IC	PPV %	NPV %	RVP	RVN	P
Cervical	9.93	2.10-46.87	77.19	94.12	3.31	0.06	0.003
Saliva	10.21	1.23-84.72	70.27	96.55	3.41	0.05	0.031

[067] Abreviaturas: IC, intervalo de confiança; PPV, valor preditivo positivo; NPV, valor preditivo negativo; RVP, razão de verossimilhança positiva; RVN, razão de verossimilhança negativa; P, probabilidade.

[068] Os pacientes foram estratificados de acordo com os resultados de genotipagem (nmPCR) em negativas, de baixo risco, alto risco e múltiplas infecções. De acordo com os resultados obtidos no exame citológico, os pacientes foram subdivididos em normal, normal com genotipagem positiva (nmPCR +), ASCUS, CIN1, NIC2, NIC3, CCE (carcinoma de células escamosas) e outras doenças (DO). Nas amostras cervicais, o grupo OD incluiu 7 pacientes com infecção por vaginose (Gardnerella vaginallis), 3 candidíase (Candida albicans) e 1 HIV positivo, enquanto em amostras salivares continha 3 vaginose (*Gardnerella vaginallis*), 2 candidíase (*Candida albicans*), 2 HIV, 2 câncer (um pâncreas e outra leucemia mieloide aguda), 3 hanseníase (*Mycobacterium leprae*), 1

leishmaniose (*Leishmania sp.)* e 1 toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*); todos eles com papanicolau normal atual (Figura 4). RP (fago randômico) fago inespecífico usado como controle negativo do C.B1. Curiosamente, houve um aumento significativo na detecção de anticorpos anti-IgA C.B1 em pacientes genótipo-positivos, equivalente a p = 0,0002 (cervical) ep = 0,0028 (saliva) em baixo risco, e p <0,0001 em alto risco risco e múltiplos genótipos, em ambos os fluidos testados, mostrando perfil semelhante para detectar anticorpos cervicais e salivares (Figuras 4A-B). Com relação aos achados citológicos, nas amostras cervicais, podemos observar aumento significativo da detecção pelo mimético nos pacientes com NIC1 (p = 0,009) e NIC2 (p = 0,004) e aumento discreto nos pacientes sem alterações celulares causadas pelo HPV mas positivas ao nmPCR (Figura 4C). Por outro lado, as amostras de saliva apresentaram aumento significativo nos pacientes positivos para nmPCR (p = 0,006) e ASCUS (p = 0,0002), cujos resultados mostraram 100% de positividade para detecção de HPV-DNA, além disso, houve tendência de aumento nos pacientes classificados em CIN1 e CIN2 (Figura 4D).

EXEMPLO 2: Avaliação da especificidade dos novos peptídeos projetados e sintetizados a partir do fago C.B1 para detecção de IgA e correlação entre os fluidos cervical e salivar.

[069] Como exemplo, a reatividade cruzada do novo peptídeo projetado e sintetizado a partir do fago C.B1 (PEP1) para anticorpos IgG, IgM e IgA foi testada em amostras cervical e saliva (Figura 5A) e em ambos os casos houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os pacientes HPV e controles. Além disso, na detecção de anticorpos tipo IgA, os pacientes HPV permaneceram acima da linha de corte média (0,203) estabelecida anteriormente. Embora as amostras cervicais testadas com IgG tenham apresentado diferença estatística entre pacientes com e sem HPV, todas as amostras testadas para IgG e IgM foram posicionadas abaixo da linha de corte. Uma correlação linear positiva foi encontrada entre as amostras cervicais e de saliva (Figura 5B), com os coeficientes de correlação de Spearman de $rs = 0,5959$ ($p < 0,0001$).

EXEMPLO 3: Validação do peptídeo sintético como plataforma de diagnóstico do HPV

[070] Para avaliar o reconhecimento destes novos peptídeos sintéticos (PEP1, PEP2, PEP3 e PEP4) a anticorpos IgA presentes em amostras cervicais e de saliva, uma membrana de nitrocelulose foi cortada e fixada em dois papéis de filtro no aparato de dot blot. Alíquotas de 10µg total de VLPs da vacina quadrivalente Gardasil® (a), usado como controle positivo para detecção de HPV, bem como 10µg de cada peptídeo (PEPP1 (b); PEP2 (c); PEP3 (d); e PEP4 (e)),

foram transferidas para a membrana de nitrocelulose sob vácuo por 20 minutos (Figura 7A). Após lavagens a membrana foi corada com solução de Ponceau e cortada para incubar 4 tiras de um pool (n = 10) de amostras de swabs cervicais de pacientes com HPV positivo (1) e de indivíduos saudáveis com HPV negativo (2) e um pool de amostras de swabs de saliva de pacientes com HPV positivo (3) e de indivíduos saudáveis com HPV negativo (4). O pool de secreção cervical foi diluído na proporção de 1:20, enquanto o pool de saliva foi feito na concentração de 1:10, ambos em tampão de bloqueio. Os blots foram incubados durante 2 horas à temperatura ambiente com agitação. As tiras foram lavadas 5 vezes e incubadas com anticorpo anti-IgA conjugado com HRP (1: 10000 em solução bloqueio) durante 1 h à temperatura ambiente sob agitação, enxugadas e os procedimentos de detecção foram realizados. Houve reconhecimento entre a vacina contra o HPV e os peptídeos 1, 3 e 4 com anticorpos IgA do pool de HPV-positivos, em fluidos cervicais (diluição 1:20) e salivares (diluição 1:10). O peptídeo 2 (PEP2), o único peptídeo projetado e sintetizado com uma repetição da sequência do clone C.B1 mostrou uma capacidade inferior de detectar IgA em amostras positivas, apresentando uma linha muito discreta na FIGURA 7A para pacientes com HPV positivo (3). Em pool negativo, ambas as amostras cervical e salivar não apresentaram interação com os peptídeos sintéticos testados,

no entanto, houve marcação discreta da vacina, que contêm VLPs não purificadas, em pool de saliva negativo. Esses resultados indicam que pode ter ocorrido reatividade cruzada com outros componentes presentes na vacina, comumente usados em várias formulações de vacinas. Para validar os novos peptídeos sintetizados como candidatos em um novo método de diagnóstico de HPV, de acesso simples e não invasivo, utilizamos os peptídeos projetados e sintetizados como plataforma de detecção em amostras salivares. Como exemplo mostraremos os resultados do PEP1.

EXEMPLO 4: Construção e análise do bioeletrodo

[071] Para avaliar e validar a aplicabilidade dos peptídeos miméticos selecionados neste trabalho, uma vez que os peptídeos 1, 2, 3 e 4 demonstraram serem capazes de detectar IgA específica para HPV em amostras de saliva e cervical positivas, os peptídeos sintéticos projetados foram imobilizados em superfície de eletrodos, como por exemplo eletrodos de grafite, de ouro, de platina, de carbono vítreo, de pasta de carbono, eletrodos com material polimérico, eletrodos modificados (por exemplo: eletrodos de grfite modificados, podendo ser com nanomateriais, nanopartículas metálicas, polímeros e etc.) dentro outros eletrodos modificados ou não conhecidos por um técnico no assunto. Nesse exemplo específico foram usados eletrodos de grafite, para detecção de HPV em amostras de saliva (Figura 8). A

título de exemplo, mostraremos aqui apenas os resultados dos testes com o PEP1 (SEQ ID N°01). Utilizou-se um pool de amostras de saliva (1:10 diluídas em tampão fosfato) de pacientes com infecção por HPV e indivíduos aparentemente saudáveis (controle negativo). Os estudos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato (CH Instruments, EUA). Um disco de grafite (6,15 mm de diâmetro, pureza de 99,99%) da Alfa Aesar foi usado como eletrodo de trabalho. Placas de platina e prata/cloreto de prata (3,0 mol.L-1) foram utilizadas nesse exemplo como eletrodos auxiliar e de referência, respectivamente. Os eletrodos auxiliar e de referência podem também ser selecionados do grupo que consiste de: eletrodo de grafite, de ouro, de platina, de carbono vítreo, de pasta de carbono, eletrodo com material polimérico e eletrodo modificado. Nesse exemplo particular foram usados eletrodos de platina modificado compreendendo uma placa de platina e prata/cloreto de prata. Todas as soluções foram desoxigenadas por nitrogênio ultra puro borbulhando por pelo menos 45 minutos antes do uso. O eletrodo de grafite foi polido mecanicamente com pasta de alumina (0,3µm), sonicada, lavada com água desionizada, seca ao ar e pré-condicionada em solução de H_2ClO_4 0,5 mol.L-1 através de voltametria cíclica entre 0 e + 1,2V, por 4 ciclos, a uma taxa de varredura de 50 mV.s − 1. A solução contendo 1,5 µg.mL-1 de sondas PEP1 foi depositada na

superfície do eletrodo e seca a 37°C por 30 minutos, sendo este procedimento realizado duas vezes. Em seguida, os eletrodos foram imersos em solução de albumina de soro bovino a 0,5% (BSA), como agente de bloqueio a 37°C durante 1 h. As amostras negativas e positivas para HPV foram aplicadas ao eletrodo a 37°C, por 30 minutos. Após cada modificação, os eletrodos foram lavados com tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,061 mol.L-1, NaH_2PO_4 0,039 mol.L-1, pH 7,4) por 5 segundos sob agitação para remover moléculas não ligadas e secas com nitrogênio ultra puro. A detecção foi realizada em solução de 10 mmol.L-1 $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ contendo 0,1 mol.L-1 KCl Os resultados mostraram aumento nos valores atuais do par redox na presença de amostra positiva para HPV, indicando que a biomolécula alvo (IgA) interagiu com o eletrodo de grafite modificado com peptídeo (Figura 7B). Houve aumento significativo (p = 0,013) nos valores de densidade de carga do pico de oxidação de $[Fe(CN)_6]4 - / [Fe(CN)_6] 3-$ na presença de amostras positivas em relação às amostras controle (Figura 7C).

Avaliação dos novos peptídeos sintetizados para uso no diagnóstico de HPV.

[072] Com todos os testes realizados, incluindo os que não foram aqui demonstrados, concluímos que dois clones de fago apresentaram alta reatividade e apresentaram melhores diferenças de sinal entre pacientes com HPV e indivíduos

aparentemente saudáveis e contra o fago aleatório (p <0,0001), os peptídeos oriundos do fago C.B1 e do A.D5 (SEQ ID No 5 e SEQ ID No 6). O peptídeo sintetizado a partir do fago C.B1, foi capaz de diferenciar amostras positivas e negativas com maior precisão e também por ter sido obtido a partir de uma estratégia de competição de VLPs contendo regiões altamente imunogênicas do HPV. Esta abordagem nos permitiu descobrir peptídeos derivados da biblioteca de peptídeos (C.B1 e A.D5) que cobrem regiões imunogênicas da proteína L1 do HPV. As proteínas do capsídeo têm papel importante na resposta imune do hospedeiro, especialmente L1, que possui epítopos conformacionais que levam à geração de anticorpos neutralizantes IgA e IgG em indivíduos infectados. Além disso, outra vantagem que os peptídeos selecionados poderiam oferecer seria a identificação de pacientes com diferentes tipos de HPV, em comparação com outras proteínas do papilomavírus; as sequências de aminoácidos da maioria das porções de L1 estão bem conservadas entre os tipos virais [(Buck C.B., et al. The papillomavirus major capsid protein L1. Virology. 2013; 445(1-2):169–174); (Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. J Biol Chem.

1999; 274(9):5810-5822)].

[073] Por exemplo, no alinhamento linear do peptídeo C.B1, houve resíduos de aminoácidos conservados e semi-conservados com proteína a proteína L1 de HPV16 (71,4%), HPV18 (85,7%), HPV45 (85,7%), HPV31 (71,4%), HPV11 (57,1 %), HPV33 (57,1%) e HPV06 (42,8%). As regiões de epítopo de proteína foram previstas pelo modo Bepipred, que combinam a propriedade de hidrofilicidade de aminoácidos com um Modelo de Markov Oculta (HMM) para prever epítopos de células B. Neste trabalho, obtivemos todos os resíduos de aminoácidos (na posição 194-200) do peptídeo C.B1 com pontuações acima do limiar quando usamos a proteína L1 de HPV16 como modelo, o que indica que o peptídeo tem potencial para induzir resposta imune humoral. A estrutura 3D do peptídeo C.B1 foi realizada por modelagem de homologia que foi amplamente utilizada em muitas áreas de análise e estudo baseados em estrutura. O servidor PDB foi usado para pesquisar as proteínas do HPV e descobriu que a estrutura do L1 HPV16 (2R5H) foi o melhor modelo com a maior identidade. Além disso, a proteína L1 do HPV16 foi analisada quanto às suas propriedades físico-químicas e estruturais-geométricas através do software Epitope Server, mostrando homologia principalmente nas regiões de antigenicidade média e alta. Os resíduos conservados e semi-conservados correspondentes ao peptídeo C.B1 representam um epítopo putativo da proteína

L1 que é conservado em diferentes tipos de HPV, o que provavelmente deu a este peptídeo a capacidade de ser reconhecido por IgA em fluidos mucosos de indivíduos infectados. Essa inferência pode ser justificada pelo fato de que resíduos semi-conservados de aminoácidos exibem propriedades físico-químicas semelhantes ao resíduo original, permitindo a ligação do anticorpo.

[074] No presente estudo, os peptídeos sintetizados a partir dos clones de fagos C.B1 e A.D5 foram capazes de detectar alto título de anticorpos IgA em amostras de HPV, discriminando significativamente fluidos positivos e negativos ($p < 0,01$; amostras cervicais e de saliva), quando comparados às classes de anticorpos IgG e IgM. Este resultado indica que a estratégia de seleção dos fagos para amostras purificadas com IgA foi bem sucedida. Além disso, o PEP1 detectou anticorpos IgA significativamente nas amostras cervicais e de saliva de pacientes classificados como de baixo risco ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente), alto risco ($p < 0,0001$; ambos) e infecção múltipla por HPV ($p < 0,0001$; ambos); quando comparado ao controle negativo. Quando as amostras cervicais foram estratificadas nos achados citológicos, houve aumento significativo da NIC1 ($p < 0,01$) e NIC2 ($p < 0,01$) com tendência à diminuição das amostras de NIC 3 e câncer (CCS) em relação ao controle. Nas amostras de saliva, houve aumento significativo do ASCUS ($p < 0,01$) e

detecção de 66,7% de NIC1, 100% de NIC2 e 33% de NIC3. Esses resultados sugerem que, após a infecção pelo HPV, o nível de anticorpos IgA locais (colo do útero) e sistêmicos (saliva) aumenta, como tentativa de controlar a infecção; no entanto, com a progressão da doença e a manutenção viral, pode haver perda da resposta imune humoral. Estudos indicam que após a infecção natural, 70-80% dos indivíduos soroconverteram para respostas de anticorpos, em contraste, uma minoria estimada entre 10-20% não remove eficazmente o vírus e mantém o DNA do HPV positivo com uma infecção viral persistente; esses indivíduos estão em risco de progressão para lesões pré-neoplásicas (NIC 2/3) e, portanto, de câncer invasivo.

[075] Outro dado relevante é que todos os pacientes diagnosticados com ASCUS (significância indeterminada) tinham presença de DNA do HPV e foram 100% detectados pelo peptídeo mimotopo em ambos os casos, tanto de secreções cervicais como em saliva ($p < 0,01$). Além disso, pacientes com resultados falso-negativos em esfregaços de Papanicolaou (nmPCR +) foram positivos em 86,6% de secreção cervical e 93,7% de saliva ($p < 0,001$), através da detecção pelo PEP-C.B1 e baixa reatividade cruzada contra outros genitais e doenças infecciosas em ambos os fluidos. Esses resultados reforçam a necessidade de confirmar o diagnóstico citológico por outro método na triagem populacional do HPV, pois essas medidas podem refletir diretamente no manejo clínico e na

estatística do câncer do colo do útero.

[076] Para validarmos uma nova plataforma de detecção de HPV, dos quatro novos peptídeos projetados e sintetizados, selecionamos os resultados obtidos com o peptídeo 1 (PEP1) para demonstrar como exemplo. O PEP1 apresenta design mais similar ao peptído mimotopo sintetizado PEP-C.B1 e foi usado os experimentos in vitro aqui mostrados como exemplo; mostrando reatividade positiva no ensaio de dot blot. Por fim, testamos um bioeletrodo em amostras de saliva, por ser não invasivo e de fácil obtenção. Nos últimos anos, pequenos peptídeos sintéticos que mimetizam ligantes a biomoléculas, como enzimas, anticorpos, receptores, proteínas transmembrana e transportadores, têm sido usados como elemento de reconhecimento biológico no desenvolvimento de biossensores com uma ampla variedade de analitos alvo [(Scarano S, Vestri A, Ermini ML, Minunni M. SPR detection of human hepcidin-25: A critical approach by immuno- and biomimetic-based biosensing. Biosens Bioelectron. 2013; 40(1):135–140); (Choi, J.H., et al. A novel Au-nanoparticle biosensor for the rapid and simple detection of PSA using a sequence-specific peptide cleavage reaction. Biosens Bioelectron. 2013; 49:415–419); (Pavan, S., et al. Short peptides as biosensor transducers. Anal. Bioanal. Chem. 2012. p. 3055–3070)]. As interações que ocorrem na superfície do eletrodo podem ser observadas através do monitoramento

das alterações na transferência de elétrons de um sistema redox bem conhecido, $[Fe(CN)_6]_4$ - / $[Fe(CN)_6]_3$-. Este par redox foi utilizado para avaliar a interação do peptídeo com as amostras no transdutor por voltametria cíclica. Estudos mostram que alguns resíduos de aminoácidos presentes em proteínas possuem cadeias laterais aromáticas, que são suscetíveis à oxidação (Enache, T. a., et al. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. Bioelectrochemistry. 2013; 89:11–8). Esse aumento dos valores atuais observados após a interação do peptídeo com anticorpos presentes em uma amostra positiva, ocorreu devido à presença desses aminoácidos oxidáveis que estão interagindo com o mediador utilizado no sistema. Os resultados mostrados aqui como exemplo indicam que o PEP1 imobilizado na superfície da grafite foi capaz de discriminar amostras negativas e positivas. Indicando assim o potencial dos novos peptídeos sintetizados aqui descritos de serem imobilizados na superfície de um eletrodo ou sensores eletroquímicos, para serem usados no diagnóstico de HPV.

[077] Neste estudo, a infecção por HPV oral não foi testada e, portanto, sua influência nos dados aqui apresentados não é conhecida. Acreditamos que os espécimes salivares tenham desempenhado um papel significativo na detecção de anticorpos, provavelmente através da comunicação

entre os diferentes compartimentos mucosos, porém estudos mais profundos ainda são necessários. O teste de fluidos orais é uma alternativa atraente para o diagnóstico, portanto, sua validação para a plataforma de bioeletrodos pode fornecer uma ferramenta útil como um co-teste para exames de Papanicolau na triagem de HPV da população.

[078] Em conclusão, os peptídeos miméticos selecionados por PD neste trabalho são capazes de detectar anticorpos IgA em amostras de saliva e cervical de pacientes HPV com alta sensibilidade e especificidade, podendo ser prontamente produzidos através de culturas bacterianas, e usados em vários ensaios, tais como ELISA, sensores eletroquímicos e muitos outros. No entanto, o mais relevante é a possibilidade de usar a saliva como aplicação direta em um teste simples de bioeletrodos, que pode ser usado para auxiliar o tratamento médico em pacientes com HPV.

Avaliação do Potencial Vacinal dos novos peptídeos sintetizados.

[079] Os peptídeos sintéticos PEP1, PEP2, PEP3 e PEP4, miméticos a epítopos da proteína L1 do HPV, foram projetados e sintetizados a partir de clones de fagos selecionados por Phage Display como demonstrado acima. Através de análises de viabilidade celular (MTT), três peptídeos foram escolhidos para avaliação do potencial vacinal para o HPV. Os peptídeos PEP1, PEP3 e PEP4 foram submetidos a análises in silico

(predição de estruturas 3D como mostrado acima e nas Figuras 6A-C), in vivo (imunização em camundongos fêmeas BALB/c) e in vitro (ELISA, Cultura de esplenócitos, CBA, Ensaio de Neutralização).

EXEMPLO 5: Ensaio de Viabilidade celular (MTT) e Formulações vacinais

[080] Para avaliar possíveis efeitos citotóxicos dos peptídeos sintetizados e determinar as concentrações ideais das formulações vacinais, utilizou-se o método colorimétrico de viabilidade celular MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Figura 9A-D). Para tanto, $5x10^5$ células de uma linhagem de macrófago murinho (J774-A1) foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços, em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de antibiótico gentamicina. As células foram incubadas a 37°C em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO_2, durante 4 horas para aderência celular. Após este período, adicionou-se os peptídeos (PEP1, PEP2, PEP3 e PEP4) nas concentrações de 1 µM, 10 µM, 20 µM e 30 µM. Ao fim da incubação de 24h com os peptídeos, foi acrescentado 10 µL de MTT aos poços de cultivo celular, na concentração de 5 mg.mL-1. Em seguida, a placa foi mantida na estufa, sob as mesmas condições já descritas, durante 4 horas. Por conseguinte, adicionou-se 50 µL de SDS (Sódio Dodecil Sulfato) a 10% e a placa foi mantida na estufa a 37°C,

durante 16h. A absorbância foi obtida em leitora de microplacas a 590 nm. Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas.

[081] Os resultados mostraram diminuição na viabilidade celular em concentrações acima de 10 µM, sobretudo para o peptídeo 2 (Figura 9b), sendo esta concentração selecionada para as formulações vacinais. Como o PEP2 revelou grande diferença estatística em doses acima de 10 µM ($p<0,0001$) quando comparadas ao controle, bem como redução de mais de 50% da viabilidade celular, optamos por excluí-lo dos ensaios *in vivo* subsequentes.

Exemplo 6: Imunização animal e Espécimes coletadas

[082] Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos da Academia Brasileira de Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo número 001/15. Os experimentos foram realizados em camundongos fêmeas BALB/c, com idades de 4-6 semanas. Três peptídeos sintetizados foram selecionados para as formulações vacinais: o peptídeo 1 (PEP1), o peptídeo quimérico 3 (PEP3) e o peptídeo 4 (PEP4). As formulações vacinais compreenderam ao menos um dos peptídeos sintetizados e ao menos um veículo, carreador e/ou adjuvante farmaceuticamente aceitável. A vacina comercial quadrivalente (Gardasil®, Merck; USA), que contém VLPs

(Virus-like particles) recombinantes montados a partir das proteínas L1 dos tipos de HPV 6, 11, 16 e 18, foi usada como controle positivo da imunização. Os camundongos foram divididos em seis grupos de cinco animais cada. As imunizações foram realizadas com 10 µM do PEP1 (grupo G1), 10 µM do PEP3 (grupo G2), bem como 10 µM do PEP4 (grupo G3); todos administrados em formulações compreendendo ao menos metade do volume de um adjuvante farmaceuticamente aceitável, na proporção 1:1 (por exemplo: nesse caso, uma suspenção de hidróxido de alumínio a 2%, conhecido por Alúmen - InvivoGen; USA – foi usada como adjuvante). O quarto grupo de animais representou o grupo controle (G4), o qual foi administrado apenas o tampão fosfato salina (PBS) estéril. No grupo controle de adjuvante (G5) foi injetado uma mistura de PBS e adjuvante, na mesma proporção das formulações vacinais. Ainda, um grupo controle positivo (G6) de imunização contra o HPV foi avaliado, administrando-se 10,5 µg do total de VLPs contidos na vacina comercial disponível em adição ao adjuvante usado nas formulações vacinais formuladas com os peptídeos sintetizados, dentro das mesmas proporções. A quantidade de VLP utilizada no estudo foi determinada de acordo com a literatura [(Schellenbacher C, et al. 2009. Chimeric L1-L2 virus-like particles as potential broad-spectrum human papillomavirus vaccines. J Virol 12 83:10085-10095); (Thönes N, Herreiner A, Schädlich

L, Piuko K, Müller M. 2008. A direct comparison of human papillomavirus type 16 L1 particles reveals a lower immunogenicity of capsomeres than viruslike particles with respect to the induced antibody response. J Virol 82:5472-5485)].

[083] As formulações vacinais foram administradas por via subcutânea (dorsal), em quatro doses, com intervalo de 15 dias entre cada dose. Antes de cada imunização, amostras de sangue via plexo retro-orbital e lavado vaginal foram coletadas para a avaliação da resposta imune humoral. O lavado vaginal foi obtido por pipetagem com 100 µL de PBS estéril, no canal vaginal das fêmeas. Duas semanas após a última imunização os animais foram eutanasiados e, além do sangue e do lavado vaginal, o baço foi removido assepticamente, para cultura de esplenócitos e análise da resposta imune celular por CBA.

EXEMPLO 7: Detecção de Anticorpos IgG e IgA por ELISA

[084] Os níveis dos anticorpos IgG no soro e IgA no lavado vaginal foram determinados por ELISA indireto. Os títulos de anticorpos IgG específicos aos peptídeos e ao controle positivo (G6) (vacina Gardasil®, Merck; USA) utilizados nas imunizações estão apresentados na Figura 10.

[085] Placas de ELISA com 96 poços de alta ligação foram sensibilizadas a 1,5 mg/poço de cada peptídeo, bem como do total de VLPs contidos na vacina comercial (VC) Gardasil®.

A reatividade inespecífica contra o BSA (1,5 mg/poço) também foi avaliada(dados não apresentados). Após a incubação, a reação foi bloqueada com 5% de PBS-BSA e amostras de soro (diluição de 1:10) e lavado vaginal (diluição de 1:5) foram adicionadas e incubadas a 37°C durante 1h. Em seguida, as amostras foram lavadas 3x em tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween20) e incubadas 1h a 37°C com os respectivos anticorpos de detecção, ambos diluídos a 1:5.000 em tampão de bloqueio. Em amostras de soro, utilizou-se o anticorpo anti-IgG, enquanto que as amostras do lavado vaginal foram testadas com o anticorpo anti-IgA, ambos específicos para camundongos e marcados com peroxidase. Ao final da incubação, os poços foram lavados 5x e revelados com OPD. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro de microplacas a 492nm.

[086] Conforme esperado, anticorpos de animais imunizados com o peptídeo quimérico PEP3 (G2) mostraram crescente e significante reconhecimento de todos os peptídeos testados após a segunda dose da formulação vacinal ($p<0,0001$; e $p<0,001$ no dia 30 ao ser testado contra o PEP4), quando comparados ao grupo controle (PBS - G4). Entretanto, este grupo não foi capaz de reconhecer VLPs presentes no grupo controle positivo (G6). Como os peptídeos sintetizados apresentam motivos miméticos a regiões de epítopo da proteína L1 do HPV, a indução de anticorpos com

especificidade para a proteína íntegra pode ser limitada. Por outro lado, a resposta imune a patógenos é naturalmente direcionada à epítopos imunodominantes. Estes resultados são corroborados por Riddell et al. (Riddell MA, et al. 2000. Identification of immunodominant and conformational epitopes in the capsid protein of hepatitis E virus by using monoclonal antibodies. J Virol 74:8011–8017) que avaliaram diferentes resíduos de aminoácidos da proteína do capsídeo do vírus da hepatite E, inferindo que epítopos imunodominantes do cápsideo podem apresentar respostas diferenciadas de anticorpos, porém importantes na geração de imunidade protetora à infecção. Os grupos de animais imunizados com os peptídeos PEP1 (G1) e PEP4 (G3) também apresentaram resposta, no entanto a mesma foi menos pronunciada na indução de anticorpos IgG, quando comparada com o PEP3 (G2).

[087] Intrigantemente, após as imunizações houve aumento da produção de anticorpos IgA na mucosa vaginal em todos os animais tratados com os peptídeos sintetizados, sobretudo após o último ciclo de vacinação (Figuras 11A-C), de modo contrário, não houve expressão de anticorpos IgA específicos a vacina comercial usada no grupo controle positivo (G6) (Figura 11d).

[088] Embora não tenha ocorrido aumento significante, os gráficos lineares (Figura 11e-h) demonstraram que os grupos

imunizados com os peptídeos PEP1 e PEP3 tenderam a produzir mais anticorpos IgA na mucosa vaginal que os demais grupos avaliados. Por outro lado, não houve detecção de anticorpos IgA específicos à vacina comercial na mucosa vaginal, nem mesmo no grupo controle positivo (G6). A produção de IgA secretora na mucosa vaginal durante a infecção natural é baixa e ocorre a longo prazo, porém esses anticorpos podem impedir sucessivas reinfecções.

[089] Embora todos os peptídeos sintetizados tenham apresentado resultados promissores, indicando que os mesmos possuem potencial para ativação da imunidade humoral local e sistêmica, acreditamos que o peptídeo sintetizado PEP3 seja o candidato com maior potencial em induzir uma proteção semelhante a infecção natural, com produção de anticorpos IgG e IgA locais e sistêmicos.

[090] Estes achados são confirmados nos estudos acima que demonstraram o potencial de uso no diagnóstico de HPV, onde estes peptídeos mimotopos foram capazes de reconhecer IgA presentes em secreções corporais, mais particularmente salivar e cervical, de pacientes infectadas por HPV.

EXEMPLO 8: Cultura de Esplenócitos e CBA

[091] A fim de avaliar a influência das diferentes formulações vacinais sobre a resposta imune celular, os baços de todos os animais foram removidos e macerados para a obtenção dos esplenócitos. Após a maceração do orgão, os

esplenócitos dos animais do mesmo grupo foram unidos em um pool e mantidos em cultura para a avaliação do perfil de resposta imune celular.

[092] A concentração das células de cada grupo foi ajustada para $5x10^5$/poço e adicionadas em placas para cultura celular de 96 poços. As células foram então tratadas com os seguintes estimulos: 10 µM do PEP1 (G1), PEP3 (G2) e PEP4 (G3); e 10,5 µg da vacina comercial (VC) (G6); todos avaliados individualmente. A concanalina A (ConA; 2,5 µg/poço) foi usada como um controle da reação (dados não mostrados). Células não tratadas também foram avaliadas (NT) (PBS; G4) e controle de adjuvante (Alúmen; G5) (Figura 12).

[093] Todos os estímulos e controles foram realizados em quadriplicatas. Por fim, a cultura foi incubada a 37°C em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO_2 pelo período de 72h. Ao final da cultura dos esplenócitos, o sobrenadante foi coletado para a dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10, por citometria de fluxo utilizando o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA; USA) Mouse Th1, Th2 e T17. Em resumo, os sobrenadantes e os padrões de citocinas do kit foram incubados com uma mistura de microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para cada citocina, e com anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 500 µL da solução de lavagem e o material foi

centrifugado a 200g, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspendidas em 100 µL da solução de lavagem para posterior leitura em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o Software FCAP Array™, por meio da obtenção de curvas de calibração obtidas dos padrões do kit, sendo a concentração dos analitos na amostra determinada em pg/mL.

[094] O mitógeno ConA foi usado apenas como controle positivo do ensaio e, sob seu estímulo, a cultura celular de todos os grupos de animais produziu citocinas, confirmando a confiabilidade do experimento *in vitro* (dados não mostrados).

[095] As citocinas representam um grupo de moléculas envolvidas na inflamação, imunidade, defesa e modulação do sistema imune à infecção pelo HPV. No presente estudo, nós avaliamos o potencial dos peptídeos sintetizados em induzir citocinas pró-(TNF- α, IFN-g, IL-17A, IL-6, IL-2) ou anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), após as imunizações. Devido os níveis indetectáveis de expressão da IL-4 em todos os grupos de animais, essa citocina não foi representada nos gráficos. Todas as análises estatísticas foram realizadas em relação ao grupo controle PBS (G4). Cada estímulo celular (NT, PEP1, PEP3, PEP4 e VC) foi avaliado individualmente.

[096] O grupo G1 (imunizado com o PEP1) não apresentou diferença significante para o TNF-α em nenhum dos estímulos

avaliados, porém percebe-se que houve um pequeno aumento entre as células não estimuladas (NT) e os peptídeos, em especial o PEP3, que provavelmente atua de maneira sinérgica visto que é um peptídeo quimérico desenhado com motivos do PEP1 e do PEP4. Em relação às citocinas inflamatórias IFN-γ, IL-17A e IL-2; o G1 não foi capaz de gerar resposta, entretanto, quando estimulado com a VC houve aumento da produção de IL-17A.

[097] A IL-10 foi significantemente expressa quando estimulada pelo PEP1 ($p<0,05$) e PEP3 ($p<0,001$). Curiosamente, a IL-6 foi produzida sob os estímulos do PEP3 e PEP4, e aumentou significativamente ($p<0,0001$) quando estimulada pela VC, apresentando um efeito semelhante ao grupo imunizado com a VC (G6).

[098] A IL-6 é uma citocina que influencia respostas imunes antígeno-específicas e reações inflamatórias, sendo considerada um dos principais mediadores da fase aguda da inflamação. Essa citocina possui papel importante no balanço das respostas Th1/Th2, promovendo diferenciação para células Th2 efetoras quando dependente de IL-4 e polarização para Th1 via sinalização de IFN-γ. Estudos sugerem que células de carcinoma cervical podem escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro através da downregulation do receptor da IL-6, indicando sua importância em induzir respostas contra a infecção por HPV.

[099] O grupo G2 (imunizado com o PEP3) manteve um padrão de resposta significantemente aumentado ($p<0,0001$) para o TNF-α quando avaliado sem estímulo e sob todos os tratamentos de peptídeos. Embora tenha diminuído a expressão do TNF-α no tratamento com a VC, ainda assim, houve aumento significante ($p<0,05$), indicando que essas células possuem potencial de resposta inflamatória mesmo frente a proteína íntegra do HPV e que a imunização com o PEP3 foi capaz de gerar um "status" inflamatório, já que as células mesmo sem estímulo in vitro produziram TNF-α significativamente.

[0100] O TNF-α é uma citocina multifuncional na resposta do hospedeiro à inflamação e na defesa contra as infecções virais e bacterianas. Essa citocina é capaz diminuir a expressão dos oncogenes E6 e E7, induzir a apoptose e impedir o crescimento de células infectadas por HPV, além de estimular e mediar respostas de quimiocinas e outros agentes inflamatórios.

[0101] O IFN-γ e a IL-17A, no grupo G2, apresentaram o mesmo padrão de resposta, com significante aumento ($p<0,0001$ e $p<0,01$, respectivamente) da produção de citocinas no estado NT e diminuição frente aos estímulos, sendo que o IFN-γ ainda se manteve significante quando estimulado por PEP1 ($p<0,01$) e PEP3 ($p<0,05$). Um efeito contrário pode ser observado com a citocina anti-inflamatória IL-10, que teve uma pequena expressão nas células não tratadas e elevação após os

estímulos PEP1 ($p<0,05$), PEP3 ($p<0,001$) e PEP4. Sabe-se que a citocina IL-10 é capaz de modular respostas imunes *in vitro* e *in vivo*, gerando down-regulation em citocinas inflamatórias como IFN-γ e IL-17. Esse mecanismo regulatório pode justificar a diminuição das respostas do IFN-γ e da IL-17A frente aos estímulos, quando comparados à expressão NT. A IL-6 teve significante aumento ($p<0,0001$) quando não tratada e sob estímulo de todos os peptídeos, sobretudo o PEP3, e embora tenha diminuído quando estimulada com a VC, ainda assim apresentou significante produção ($p<0,05$). Interessantemente, houve importante elevação ($p<0,0001$) da produção de IL-2 com manutenção dos níveis frente todos os estímulos. Estes resultados sugerem que as imunizações com os peptídeos sintetizados, particularmente com o peptídeo quimérico PEP3, induziram um status inflamatório nas células imunes, possibilitando mecanismos de resposta celular com desvio para o perfil Th1, criticamente importante para a proteção contra o HPV. O grupo G3 (imunizado com o PEP4) apresentou discreto aumento de TNF-α apenas quando estimulado pelo PEP3. Além disso, houve importante expressão de IL-17A quando as células não foram tratadas ($p<0,01$) e estímulo da VC ($p<0,01$) e ligeiro aumento de IL-6 sob tratamentos com o PEP3 e PEP4. De fato, o PEP4 foi o peptídeo sintetizado que menos gerou respostas imunes relevantemente protetoras à infecção por HPV. Os resultados de

bioinformática revelaram que a região mimética ao peptídeo é menos exposta, o que pode justificar um pouco esse resultado menor quando comparado com os outros peptídeos. Contudo, o peptídeo quimérico que apresenta motivos do PEP1 e PEP4 parece agir de maneira sinérgica, indicando que, embora o PEP4 esteja em uma região de difícil acesso para a geração de resposta imune, trata-se de uma região importante para a indução de imunidade ao HPV.

[0102] Os animais imunizados com a vacina quadrivalente comercial (VC) do HPV, grupo G6, apresentaram significante aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6 ($p<0,0001$ para ambas) após estímulo in vitro com a própria vacina e discreto aumento de ambos na presença dos peptídeos. As citocinas IL-17A e IL-2 tiveram respostas semelhantes, com produção significante ($p<0,0001$ para ambas) apenas quando tratadas com a VC. O IFN-γ não foi suficientemente produzido no grupo G6, porém possui papel crucial na regulação de quase todas as fases das respostas imunitárias e inflamatórias, sendo importante para a manutenção do perfil Th1 que confere proteção contra as infecções virais. Por outro lado, houve alta expressão da IL-10 ($p<0,0001$) sob estímulo da VC. A IL-10 é uma citocina pleiotrópica capaz de inibir a síntese de outras citocinas, especialmente o IFN-γ, além de impedir a proliferação de células Th1, mas é capaz de manter o desenvolvimento de respostas Th2, importantes

para a produção de anticorpos. Possivelmente, houve uma prevalência do perfil Th2 e conseguinte inibição de IFN-γ após a imunização com a vacina comercial.

[0103] O principal mecanismo envolvido na resposta imune contra a infecção pelo HPV parece ser a resposta celular adaptativa. Estudos observaram uma importante correlação entre o aumento do infiltrado de linfócitos T (CD4+ e CD8+) e macrófagos e a regressão espontânea de verrugas genitais. Este infiltrado teria um importante papel no combate à infecção por secretar citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN-γ e TNF-α, demonstrando predomínio de reposta do tipo Th1. Por outro lado, indivíduos imunodeprimidos (HIV positivos ou transplantados) apresentam maior risco de infecção por HPV e progressão para as malignidades associadas ao vírus.

[0104] Nossos resultados sugerem que os peptídeos sintetizados são capazes de imunomodular respostas celulares a um perfil Th1 e, ainda, sensibilizam células imunes a um status inflamatório propício para atuação antiviral.

[0105] Em resumo, demonstramos que os peptídeos sintetizados, miméticos da proteína L1 do HPV, são capazes de detectar anticorpos IgA em amostras de fluidos corporais de pacientes com HPV. Os peptídeos sintetizados também foram capazes de eliciar respostas imunes humorais séricas (IgG) e de mucosa vaginal (IgA) *in vivo*. Além disso, os referidos

peptídeos induziram importante resposta imune celular com upregulation de citocinas pró-inflamatórias e desvio para um perfil Th1. Curiosamente, o peptídeo quimérico (PEP3) parece atuar de forma sinérgica, potencializando respostas humorais e celulares, com possível produção de anticorpos neutralizantes para o HPV-16, indicando uma aplicabilidade profilática mais atrativa.

[0106] Portanto, o presente pedido de patente descreve Peptídeos sintéticos miméticos a proteína L1 do HPV que compreendem uma das sequências de aminoácidos selecionada do grupo que consite de: SEQ ID Nº 01, SEQ ID Nº 02, SEQ ID Nº 03, SEQ ID Nº 04, SEQ ID Nº 05 e SEQ ID Nº 06, ou uma sequência tendo pelo menos 85% de identidade ou similaridade com umas das sequências de aminoácidos selecionada do grupo que consite de: SEQ ID Nº 01, SEQ ID Nº 02, SEQ ID Nº 03, SEQ ID Nº 04 , SEQ ID Nº 05 e SEQ ID Nº 06. Em que o peptídeo sintético é para uso em um método de diagnóstico do HPV ou para uso no tratamento e/ou profilaxia de HPV.

[0107] Descreve composições farmacêuticas que compreendem pelo menos um dos peptídeos sintéticos tal como descritos no presente pedido, e pelo menos um veículo, carreador, adjuvante e/ou composto farmacêuticamente aceitável. Em que a composição farmacêutica é uma vacina e pode compreender adicionalmente uma solução de hidróxido de alumínio como adjuvante. A referida composição farmacêutica sendo para uso

no tratamento e/ou profilaxia do HPV.

[0108] Descreve o uso de ao menos um dos peptídeos sintéticos descritos no presente pedido ou da composição farmacêutica descrita no presente pedido para a preparação de uma composição imunogênica ou vacina para uso no tratamento e/ou profilaxia do HPV.

[0109] Descreve o uso de ao menos um dos peptídeos sintéticos descritos no presente pedido em um método de diagnóstico do HPV.

[0110] Descreve um método de diagnóstico de HPV em que compreende as etapas de:

- preparar a amostra biológica, em que a amostra biológica é preferencialmente um fluído corporal;
- colocar a amostra em contato com ao menos um dos peptídeos sintetizados tal como definidos na reivindicação 1; e
- ler o resultado.

[0111] O referido método pode ser usado como um ensaio de ELISA ou como um ensaio de detecção eletroquímica.

[0112] O ensaio de detecção eletroquímica compreende:

- preparação de um bioeletrodo;
- incorporação ou imobilização de ao menos um dos peptídeos sintéticos tal como definidos na reivindicação 1 no referido bioeletrodo;

- preparação do bioeletrodo com o peptído incorporado ou imobilizado para receber a amostra biológica;

- preparação para leitura do conjunto bioeletrodo, peptídeo sintético imobilizado e amostra biológica;

- leitura do resultado.

[0113] Em que o bioeletrodo é um eletrodo de grafite e que o método compreende ainda eletrodos auxiliares e/ou de referência, mas particularmente em que tais eletrodos compreendem uma placa de platina e prata/cloreto de prata.

[0114] Descreve um sistema de diagnóstico de HPV por detecção eletroquímica em que que compreende ao menos um eletrodo e ao menos um dos peptídeos sintéticos tal como descritos no presente pedido. Em que o eletrodo é um eletrodo de grafite e em que o mesmo compreende ao menos um dos peptídeos sintéticos tal como definidos na reivindicação 1 incoporados ou imobilizados na sua superfície.

[0115] O sistema ainda compreende eletrodos auxiliares e/ou de referência, mas particularmente em que tais eletrodos compreendem uma placa de platina e prata/cloreto de prata, bem como ainda compreende um potenciostato ou aparelho similar para leitura do resultado.

[0116] Descreve um método de tratamento e/ou profilático de HPV em que compreende administrar em um indivíduo uma dose farmaceuticamente efetiva de pelo menos um dos peptídeos sintéticos tal como descritos no presente pedido ou uma

composição farmacêutica tal como descrita no presente pedido.

[0117] Embora o presente pedido de patente tenha descrito a matéria objeto da presente invenção com um certo grau de detalhamento a título de ilustração e exemplificação para fins de clareza e compreensão, será evidente que certas alterações e modificações podem ser praticadas no escopo das reivindicações em anexo.

[0118] Os exemplos descritos neste relatório não são limitativos, permitindo que um técnico no assunto altere alguns aspectos ou componentes da presente ivenção, equivalentes aos peptídeos sintéticos, composições ou usos aqui descritos, sem se distanciar do escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1 – Peptídeo sintético mimético a proteína L1 do HPV **caracterizado pelo** fato de que compreende uma das sequências de aminoácidos selecionada do grupo que consite de: SEQ ID Nº 01, SEQ ID Nº 02, SEQ ID Nº 03, SEQ ID Nº 04, SEQ ID Nº 05 e SEQ ID Nº 06, ou uma sequência tendo pelo menos 85% de identidade ou similaridade com umas das sequências de aminoácidos selecionada do grupo que consite de: SEQ ID Nº 01, SEQ ID Nº 02, SEQ ID Nº 03, SEQ ID Nº 04 , SEQ ID Nº 05 e SEQ ID Nº 06.

2 – Peptídeo sintético de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que é para uso em um método de diagnóstico do HPV.

3- Peptídeo sintético de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que é para uso no tratamento e/ou profilaxia de HPV.

4 – Composição farmacêutica **caracterizada pelo** fato de que compreende pelo menos um dos peptídeos sintéticos tal como descritos na reivindicação 1, e pelo menos um veículo, carreador, adjuvante e/ou composto farmacêuticamente aceitável.

5- Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 4 **caracterizada pelo** fato de que é uma vacina.

6 - Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que compreende uma solução de hidróxido de alumínio como adjuvante.

7 - Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada pelo** fato de que é para uso no tratamento e/ou profilaxia do HPV.

8 – Uso de ao menos um dos peptídeos sintéticos tal como descritos na reivindicação 1 ou da composição farmacêutica tal como descrita em qualquer uma das reivindicações 4 a 7, **caracterizado pelo** fato de que é para a preparação de uma composição imunogênica ou vacina para uso no tratamento e/ou profilaxia do HPV.

10- Uso de ao menos um dos peptídeos sintéticos tal como descritos na reivindicação 1 **caracterizada pelo** fato de que é em um método de diagnóstico do HPV.

11- Método de diagnóstico de HPV **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

- preparar a amostra biológica, em que a amostra biológica é preferencialmente um fluído corporal;

- colocar a amostra em contato com ao menos um dos peptídeos sintetizados tal como definidos na reivindicação 1; e

- ler o resultado.

12- Método de diagnóstico de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o referido método pode ser usado como um ensaio de ELISA ou como um ensaio de detecção eletroquímica.

13- Método de diagnóstico de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o ensaio de detecção eletroquímica compreende:

- preparação de um bioeletrodo em que compreende a incorporação ou imobilização de ao menos um dos peptídeos sintéticos tal como definidos na reivindicação 1 em um eletrodo;

- preparação do bioeletrodo, com o peptído incorporado ou imobilizado, para receber a amostra biológica;

- preparação para leitura do conjunto bioeletrodo, peptídeo sintético imobilizado e amostra biológica;

- leitura do resultado.

14- Método de diagnóstico de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o eletrodo é um eletrodo selecionado do grupo que consiste de: eletrodo de grafite, de ouro, de platina, de carbono vítreo, de pasta de carbono, eletrodo com material polimérico e eletrodo modificado.

15- Método de diagnóstico de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda eletrodos auxiliares e/ou de referência, particularmente em que tais eletrodos são selecionados do grupo que consiste de: eletrodo de grafite, de ouro, de platina, de carbono vítreo, de pasta de carbono, eletrodo com material polimérico e eletrodo modificado, mais particularmente em que o eletrodo é um eletrodo de platina modificado compreendendo uma placa de platina e prata/cloreto de prata.

16- Sistema de diagnóstico de HPV por detecção eletroquímica, **caracterizado** pelo fato de que compreende um bioeletrodo em que compreende ao menos um eletrodo e ao menos um dos peptídeos sintéticos tal como definidos na reivindicação 1.

17- Sistema de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que o eletrodo é um eletrodo selecionado do grupo que consiste de: eletrodo de grafite, de ouro, de platina, de carbono vítreo, de pasta de carbono, eletrodo com material polimérico e eletrodo modificado, em que o mesmo compreende ao menos um dos peptídeos sintéticos tal como definidos na reivindicação 1 incoporados ou imobilizados na sua superfície.

18- Sistema de acordo com a reivindicação 16 ou 17, **caracterizado** pelo fato de que ainda compreende eletrodos auxiliares e/ou de referência, particularmente em que tais eletrodos são selecionados do grupo que consiste de: eletrodo de grafite, de ouro, de platina, de carbono vítreo, de pasta de carbono, eletrodo com material polimérico e eletrodo modificado, mais particularmente em que o eletrodo é um eletrodo de platina modificado compreendendo uma placa de platina e prata/cloreto de prata.

19- Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um potenciostato para leitura do resultado.

20- Método de tratamento e/ou profilático de HPV, **caracterizada pelo** fato de que compreende administrar em um indivíduo uma dose farmaceuticamente efetiva de pelo menos um dos peptídeos sintéticos tal como descritona reivindicação 1 ou uma composição farmacêutica tal como descrita em qualquer uma das reivindicações 4 a 7.

A

Phage Clone Identifier	Amino Acid Sequence	Frequency[a]
	Competitive selection strategy	
C.E11	TRADGTS	2/13
C.C11	FYGDRYI	1/13
C.D9	TYKGQSI	1/13
C.F2	TLPNMKD	1/13
C.C2	GLKALKE	1/13
C.H1	SGMSRLI	1/13
C.F1	THMHRET	1/13
C.E1	DGHWTES	1/13
C.D1	HDLNGSM	1/13
C.C1	RGISASM	1/13
C.B1	HHPTSNV	1/13
C.A1	DSSEVMS	1/13
	Acid selection strategy	
A.H11	QVKIANT	1/52
A.G11	SPAKPNR	1/52
A.C4	LHSPLMA	1/52
A.A11	PANGTWH	1/52
A.D10	MYHGRTI	1/52
A.C10	KTHPDGT	1/52
A.A10	TDWRLQY	1/52
A.F9	NYNRDGT	1/52
A.A4	TSVLNNT	1/52
A.F8	EYEGRYI	1/52
A.B8	QNPNQKF	1/52
A.H7	TNKIANQ	1/52
A.B5	NSFRHNL	1/52
A.D7	LILRDGT	3/52
A.A7	MYNGRSI	2/52
A.C6	YWNGRNI	8/52
A.G5	KVKTGND	8/52
A.E5	DNFESYS	6/52
A.D5	EYEGRNI	3/52
A.C5	VEELPLF	9/52
RP[b]	DANIEKTFGQNY	-

B

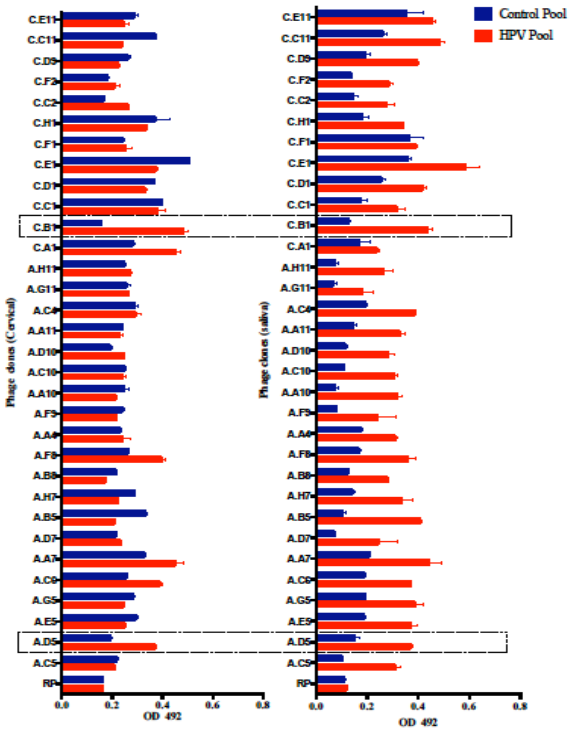


FIGURA 1

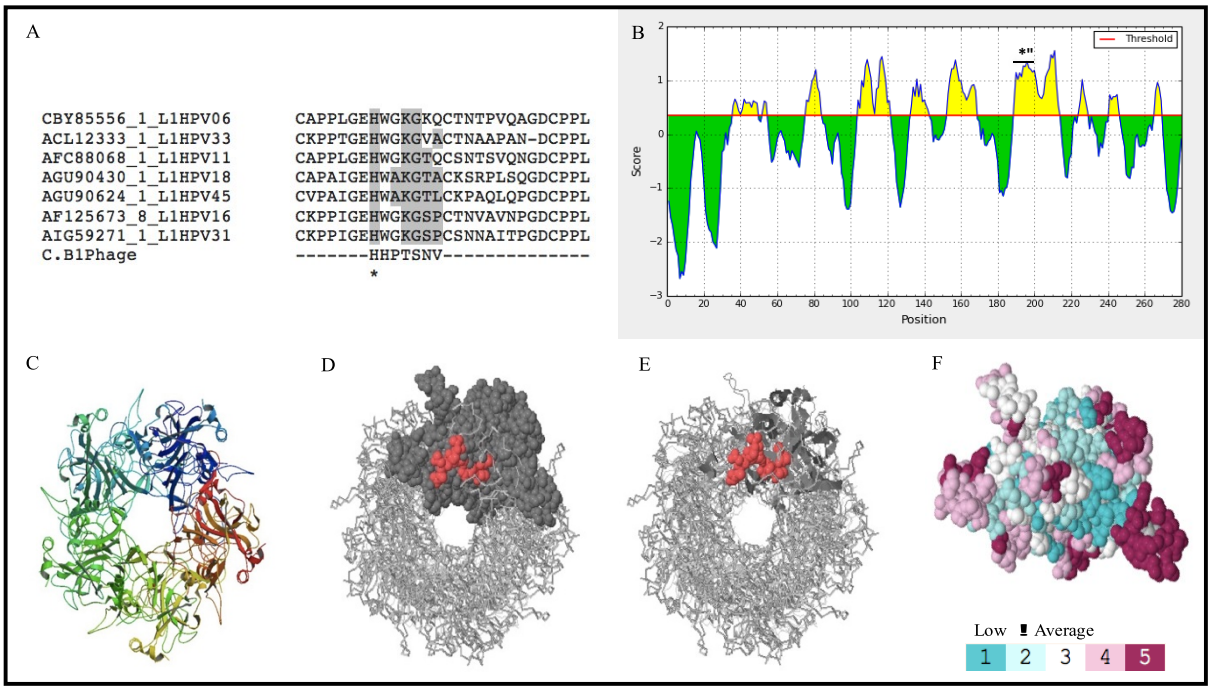


FIGURA 2

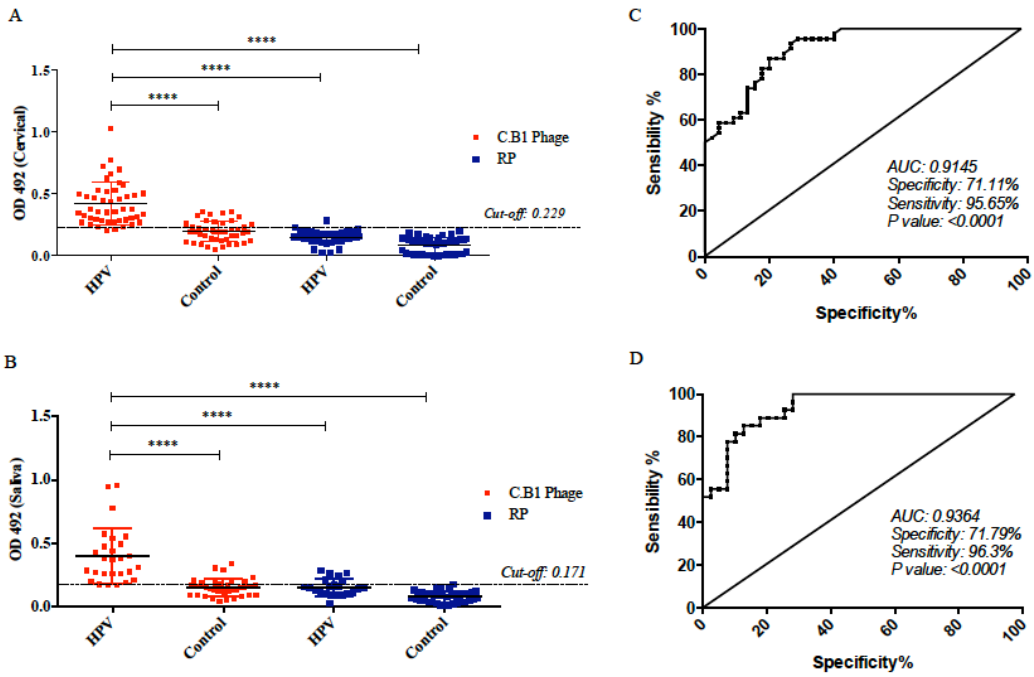

A
B
C
D
OD 492 (Cervical)
OD 492 (Saliva)
C.B1 Phage
RP
Cut-off: 0.229
Cut-off: 0.171
HPV
Control
Sensibility %
Specificity%
AUC: 0.9145
Specificity: 71.11%
Sensitivity: 95.65%
P value: <0.0001
AUC: 0.9364
Specificity: 71.79%
Sensitivity: 96.3%
P value: <0.0001

FIGURA 3

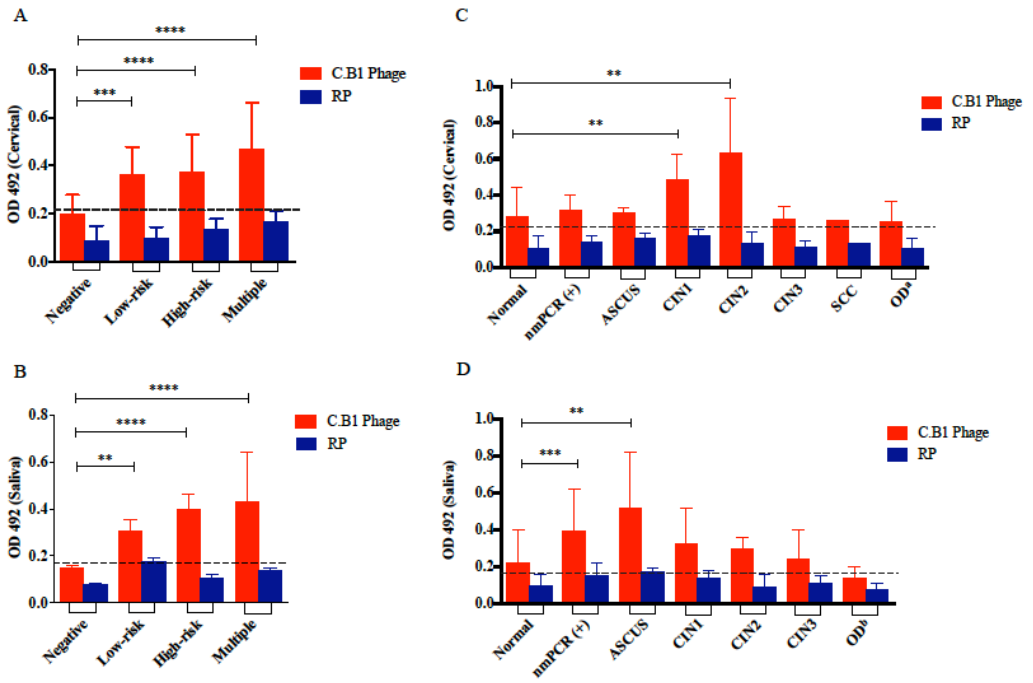

A
B
C
D
OD 492 (Cervical)
OD 492 (Saliva)
C.B1 Phage
RP
Negative
Low-risk
High-risk
Multiple
Normal
nmPCR (+)
ASCUS
CIN1
CIN2
CIN3
SCC
OD*

FIGURA 4

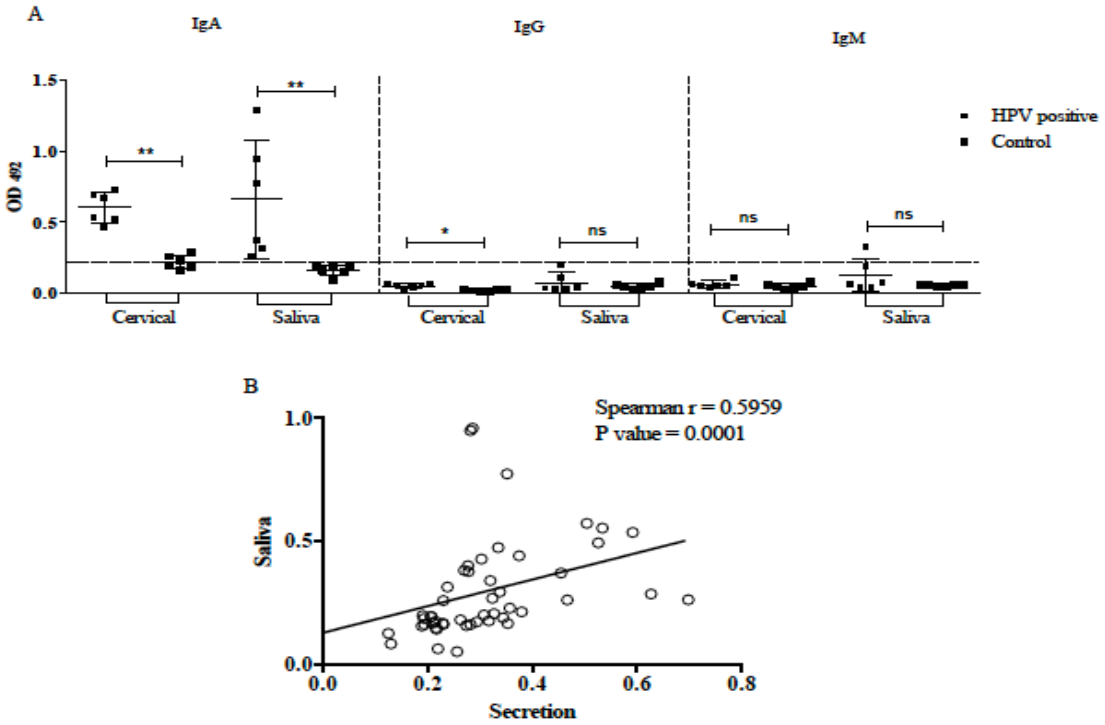


FIGURA 5

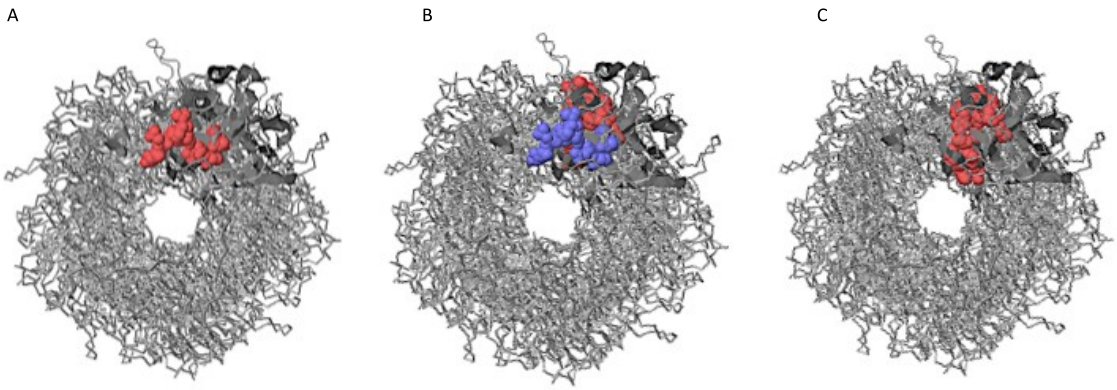


FIGURA 6

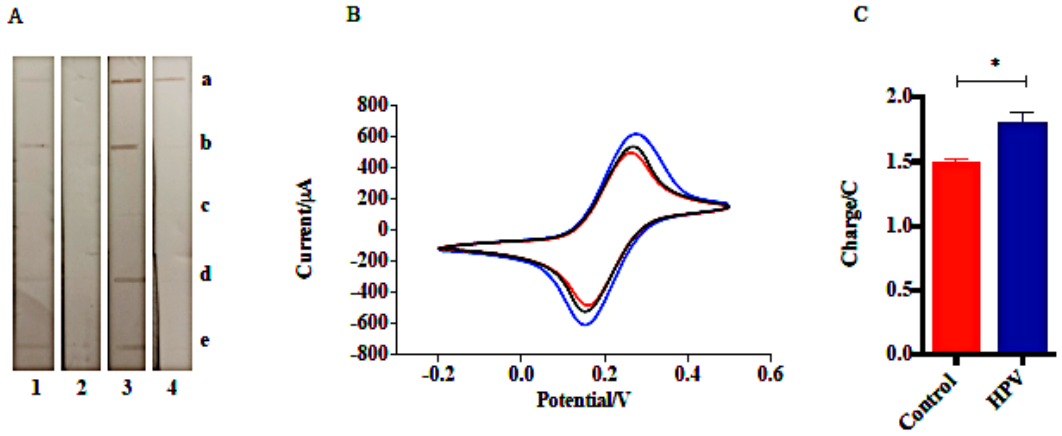


FIGURA 7

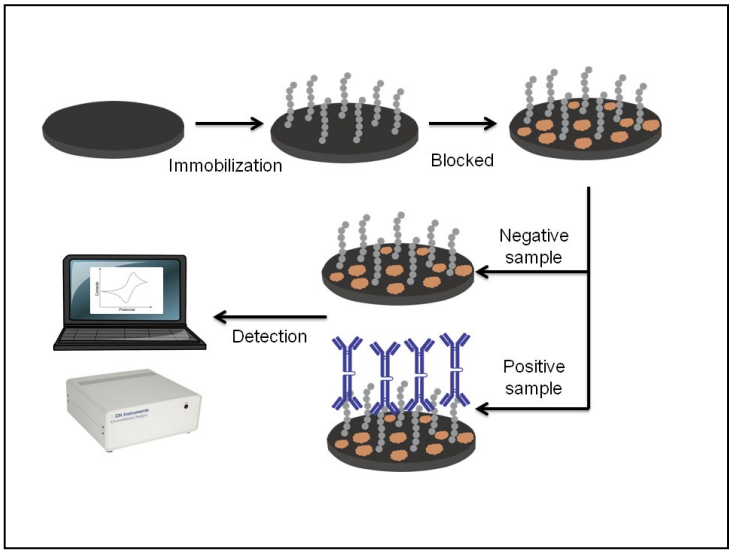


FIGURA 8

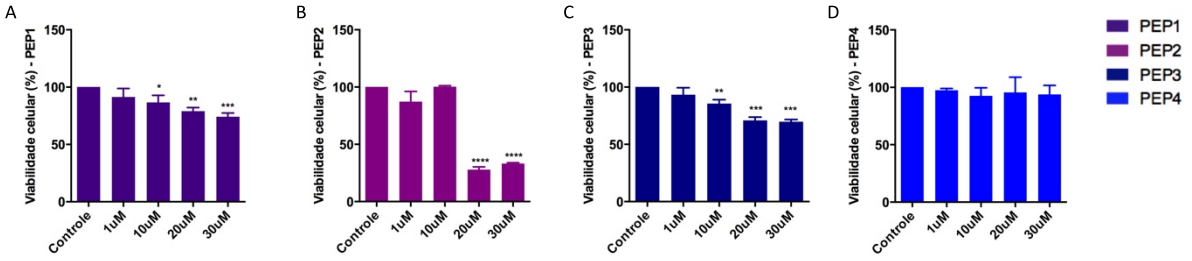


FIGURA 9

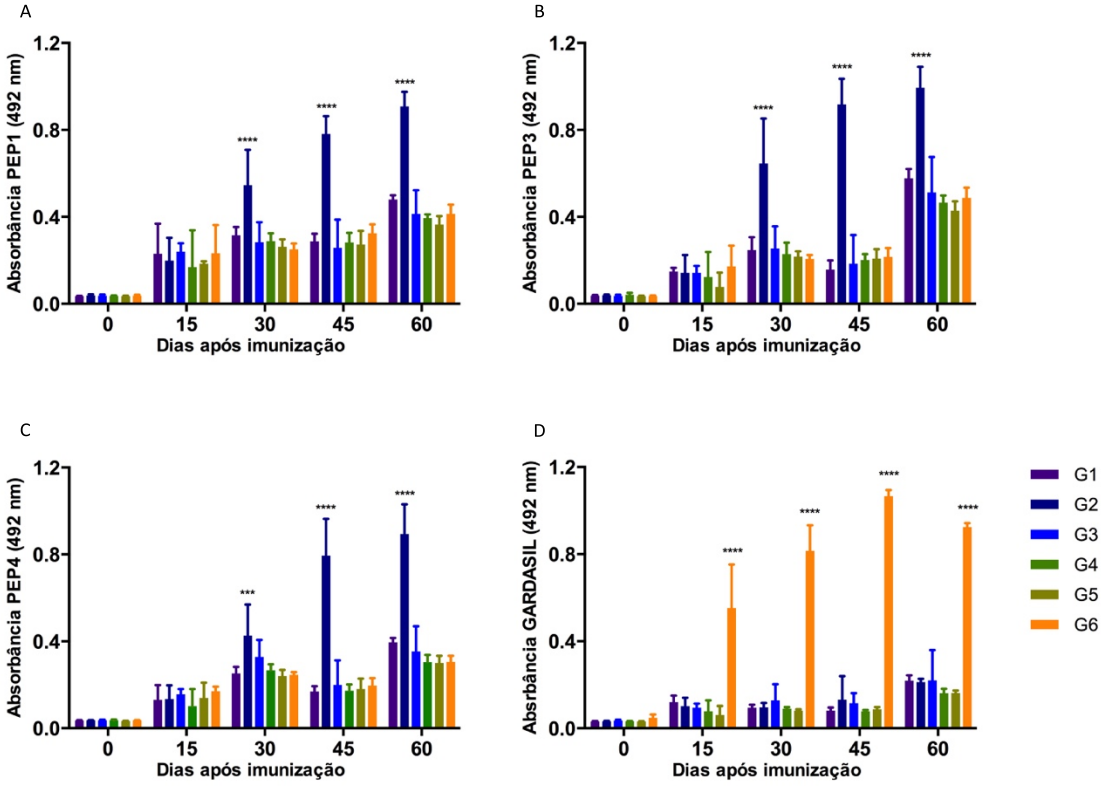


FIGURA 10

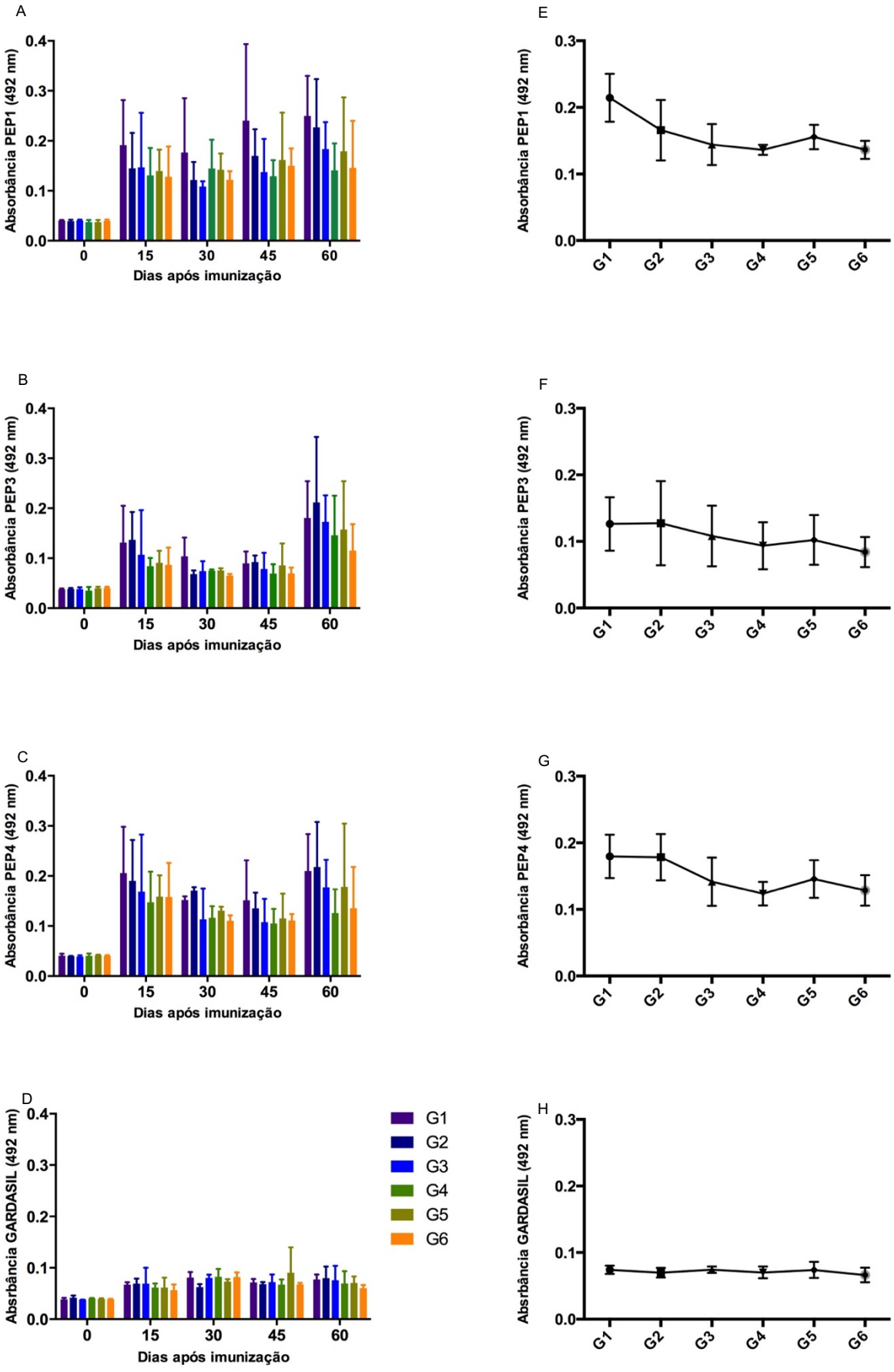

A
Absorbância PEP1 (492 nm)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
15
30
45
60
Dias após imunização
E
Absorbância PEP1 (492 nm)
0.3
0.2
0.1
0.0
G1
G2
G3
G4
G5
G6
B
Absorbância PEP3 (492 nm)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
15
30
45
60
Dias após imunização
F
Absorbância PEP3 (492 nm)
0.3
0.2
0.1
0.0
G1
G2
G3
G4
G5
G6
C
Absorbância PEP4 (492 nm)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
15
30
45
60
Dias após imunização
G
Absorbância PEP4 (492 nm)
0.3
0.2
0.1
0.0
G1
G2
G3
G4
G5
G6
D
Absrbância GARDASIL (492 nm)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
15
30
45
60
Dias após imunização
G1
G2
G3
G4
G5
G6
H
Absrbância GARDASIL (492 nm)
0.3
0.2
0.1
0.0
G1
G2
G3
G4
G5
G6

FIGURA 11

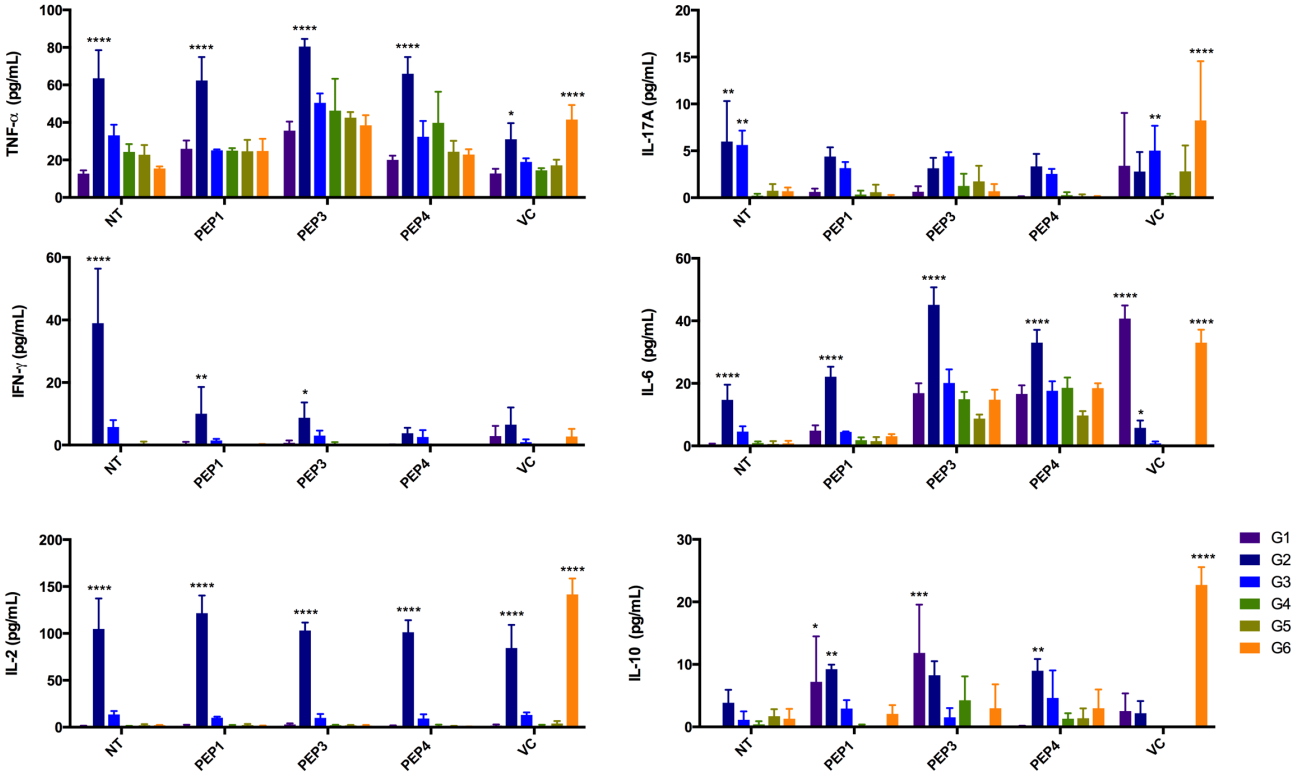

TNF-α (pg/mL)
IL-17A (pg/mL)
IFN-γ (pg/mL)
IL-6 (pg/mL)
IL-2 (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
NT
PEP1
PEP3
PEP4
VC
G1
G2
G3
G4
G5
G6

FIGURA 12

Resumo da Patente de Invenção: **"PEPTÍDEOS SINTÉTICOS MIMÉTICOS A PROTEÍNA L1 DO HPV, MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE HPV, SISTEMA DE DIAGNÓSTICO DE HPV, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS MESMOS NO TRATAMENTO OU PROFILAXIA DO HPV".**

A presente invenção refere-se à seleção e caracterização de peptídeos sintéticos, projetados e sintetizados a partir da análise de clones de fagos mimetopos do epítopo imunológico da proteína L1 do papilomavírus humano (HPV). Mais particularmente os peptídeos sintetizados foram imunorreativos e capazes de detectar anticorpos IgA em amostras de fluidos corporais de pacientes com HPV, podendo ser utilizados no diagnóstico do HPV. Além disso, os peptídeos sintetizados foram capazes de provocar resposta imune *in vivo*. Particularmente a presente inveção refere-se à seleção, caracterização e utilização desses novos peptídeos sintetizados tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento e/ou profilaxia do HPV. Além disso, a presente invenção ainda descreve um método de diagnóstico de HPV e uma composição farmacêutica compreendendo ao menos um destes novos peptídeos sintetizados e o uso destes peptídeos para preparar medicamentos ou composições imunogências para o tratamento e/ou profilaxia de HPV.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQ.- I.11.011.PI-BR.txt
- Data de Geração do Código: 03/04/2020
- Hora de Geração do Código: 21:37:42
- Código de Controle:
  - Campo 1: 71F52CAF16CAC9F3
  - Campo 2: 35A4C55244D645C0