



“PEPTÍDEOS RECOMBINANTES E MOTIVOS PROTEICOS MIMÉTICOS A ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA* E SUAS APLICAÇÕES”

A presente invenção refere-se à seleção, caracterização e utilização de peptídeos recombinantes, suas sequências reversas e motivos proteicos que mimetizam regiões antigênicas parciais de proteínas de *Leishmania* e antígenos de interesse diagnóstico e vacinal para as doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. Os peptídeos objetos desta invenção são alvos a serem utilizados em imunodiagnósticos e em composições vacinais para o controle dos diferentes tipos de doença provocados pelos parasitos do gênero acima citado:

Apesar do progresso no diagnóstico e no tratamento, as leishmanioses continuam sendo um problema de saúde pública, particularmente nos países em desenvolvimento. O impacto das leishmanioses na saúde humana foi grosseiramente subestimado por muitos anos, sendo esta doença hoje classificada como uma das principais doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (Zimmermann S. et al., *Protist.*; 160:151-8, 2009).

O agente causador das Leishmanioses, *Leishmania*, é um parasito tripanossomatídeo intracelular obrigatório, que tem um ciclo de vida bifásico consistindo de um estágio promastigoto uniflagelado, que reside dentro do trato digestivo do vetor e um estágio amastigoto, que se multiplica dentro dos fagolissomos de macrófagos de células de mamíferos (Wong A. K. C. *Biochem. Cell Biol.*; 73:235-40, 1984). Existem 30 espécies de *Leishmania* das quais 10 ocorrem no Velho Mundo e 20 no Novo Mundo. Todas as espécies do Velho Mundo pertencem ao subgênero *Leishmania* e sete são conhecidas por infectar o homem. Existem também 11 espécies do mesmo subgênero no Novo Mundo, das quais cinco não são encontradas no homem. Parasitos do subgênero *Viannia* ocorrem somente no Novo Mundo e das nove espécies conhecidas, oito infectam o homem (Shaw J. J. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 89:471-8, 1994).

Parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos por picadas de

mosquitos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomya* no Novo Mundo (Desjeux P. H., Clin. Dermatol.; 80:271-4, 1996, Grimaldi G. Tesh R. B., Clin. Microbiol. Rev.; 6:230-50, 1993).

5 Dependendo da espécie do parasito e da condição imunológica do hospedeiro, as manifestações podem variar de lesões cutâneas crônicas à forma letal da infecção (Murray H. W. et al., *Lancet*, 366:1561-1567, 2005), apresentando o seguinte espectro de manifestações clínicas: a leishmaniose tegumentar que varia da forma cutânea à mucocutânea (LC e LMC), representando o pólo responsivo para a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e
10 a leishmaniose visceral (LV) que abrange a forma subclínica e a doença fatal (Oliveira C. I. et al., *Drug. Discov. Today: Dis. Models*; 1:81-6, 2004).

A Leishmaniose é um problema de saúde pública e afeta 88 países, sendo 72 classificados como países em desenvolvimento, incluindo 13 dos países menos desenvolvidos. Dos casos de LV, 90% ocorrem em apenas cinco
15 países – Bangladesh, Índia, Nepal e Brasil; 90% dos casos de LC ocorrem em apenas sete países - Afeganistão, Algeria, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. A incidência anual das leishmanioses é de 1,5 a 2 milhões de casos, sendo 1-1,5 milhão para leishmaniose cutânea e 500.000 para a forma visceral; tendo a urbanização como um fator crucial para a incidência (WHO. *The Weekly
20 Epidemiological Record*, 77:365-72, 2002 e www.who.int/tdr/diseases/leish).

A leishmaniose brasileira comportava-se como uma antroponose rural, mas, após a década de 80, observou-se sua expansão também para as regiões periurbanas de grandes cidades. Mudanças ambientais causadas pelos humanos têm modificado o perfil epidemiológico das leishmanioses em áreas
25 onde é relacionada com a vida selvagem, assim como em áreas onde a transmissão dá-se em áreas rurais periurbanas ou vizinhança urbana e áreas em volta das casas. Em cada área, a transmissão depende da adaptação das espécies de mosquito (potenciais vetores) a estes ambientes e envolve animais domésticos (*L. chagasi*, causando a forma visceral da leishmaniose, e *L. braziliensis*, causando a forma cutânea e mucosa) (Tolezano J. E. et al., *Rev. Inst. Adolfo Lutz*; 40:49-54, 1980; Marzochi M. C. A. *J. Bras. Med.*; 63:82-104,
30

1992; Marzochi M. C. A. et al., *Cad. Saude Publica*; 10:359-75, 1994).

Várias espécies de mamíferos têm sido reportadas como naturalmente infectadas por *Leishmania* spp., em áreas endêmicas os cães são considerados os maiores reservatórios da Leishmaniose Visceral Humana (Palatinik-de-Souza, C. B. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 65:510-517, 2001 e WHO, Report of the Second WHO Meeting on Emerging Infectious Diseases, 1995).

O diagnóstico da LV não pode ser baseado somente nos sintomas clínicos porque esta compartilha seus sintomas com outras doenças como a malária, febre tifóide e tuberculose, ocorrendo comumente na mesma área das leishmanioses (Goto Y. et al, *Infect. Immun.*; 74:3939-45, 2006). Para a LV zoonótica, um diagnóstico rápido e seguro é ferramenta necessária em função da grande variabilidade de sintomas clínicos e da presença de cães assintomáticos, porém infectivos (Dye C et al., *Epidemiol Infect.*; 103:647-56, 1993). O número de pessoas infectadas assintomáticas é mais alto que o número de pessoas infectadas que apresentam sintomas da doença. Por esta razão, é importante saber como pessoas infectadas vão desenvolver a doença e como elas podem ser diagnosticadas antes de mostrarem as manifestações clínicas (Singh S. et al., *J. Parasitol.*; 81:1000-3, 1995).

A escolha dos antígenos é importante, pois o uso de antígenos totais ou parasitas inteiros, frequentemente resultam em uma baixa especificidade na detecção de anticorpos específicos para a doença (Reed S. G. et al., *J Immunol.*; 138:1596-601, 1987).

Nos últimos anos, vários antígenos têm sido caracterizados com a finalidade de melhorar o potencial vacinal e o diagnóstico da leishmaniose humana e canina. O desenvolvimento da reação em cadeia de polimerase e imunoensaios baseados em antígenos recombinantes são destinados a melhorar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico da Leishmaniose Visceral e diminuir a reatividade cruzada mostrada por antígenos totais (Gomes Y. M. et al., *Vet. J.*; 175:45-52, 2008).

O medicamento mais comumente usado, desde a década de 50, é o

antimoniato N-metil Glucamina (Glucantime®) e permanece como método de escolha para o tratamento inicial, que apresenta resistência em 10% dos casos. Nessa circunstância, utiliza-se a Anfotericina B, que foi recentemente associada a partículas de lipossomos (partículas lipídicas artificiais), reduzindo os efeitos sistêmicos provocados pelo tratamento (Berman J. D. *Clin. Infect. Dis.*; 24:684-703, 1997 e Lee M. B. et al., *Infect. Med.*; 16:34-45, 1999).

Na situação atual, a quimioterapia não tem sido suficiente para o controle zoonótico da leishmaniose visceral e a vacinação necessita ser considerada; o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência e susceptibilidade a infecção por *Leishmania* é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas imunoproláticas (Rosa R. et al., *Vaccine*; 25:4525-32, 2007).

Nos últimos anos, a clonagem de DNA e a caracterização de antígenos e proteínas recombinantes derivadas de *Leishmania* têm sido realizadas, levando a um grande avanço nos métodos diagnósticos e na busca de uma vacina eficaz para a profilaxia das leishmanioses. Alguns desses antígenos são descritos abaixo.

Moléculas como Glicosilfosfatidilinositol (GPI), Glicosilfosfolipídios (GIPL), Lipofosfoglicanos (LPG), Fosfoglicanos (FG), Proteofosfoglicanos (PPG), Leishmaniolisina (gp63) e Cisteína Proteases (CPs), são discriminadas como cruciais para a infecção por *Leishmania*, mas não produzem nenhuma patologia no hospedeiro (Chang K. P. et al., *Kinetoplast. Biol. Dis.*; 1:1, 2002).

As Proteínas de Superfície de Promastigotos (PSP), também conhecidas como gp63, são glicoproteínas de superfície de membrana que possuem atividade proteolítica, esta proteína é altamente imunogênica, apresentando reatividade cruzada entre as diferentes espécies de *Leishmania*, embora os anticorpos produzidos por essa molécula não sejam efetores no controle da infecção (Mood S. F. *Acta Trop.*; 53:185-204, 1993 e Wright E. P. et al., *Biochem. Cell Biol.*; 525-36, 1989). A expressão diferencial dos genes gp63 resulta em diferentes quantidades da proteína gp63 no desenvolvimento *in vitro* das formas promastigotas para a forma infecciosa (Ramamoorthy R. et al., *J.*

Biol. Chem.; 267:1888-95, **1992**).

Glicoconjugados ligantes de Fucose-Manose (FML) constituem um complexo de proteínas antigênicas de formas promastigostas de *L. (L.) donovani* que são utilizados em testes sorológicos para diagnóstico, avaliação do prognóstico e controle do calazar humano, além de serem propostos em triagens de doadores de sangue de regiões endêmicas de calazar (Otero A. C. S. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 62:128-131, **2000** e Palatinik de Souza C. B. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 89:390-3, **1995**).

O principal componente imunoprotetor da FML é a fração glicoprotéica designada GP36 (Paraguai de Souza E. et al., *Vaccine*, 19:3014-15, **2001**), reconhecido unicamente por soros de pacientes com calazar humano (Palatinik de Souza C. B. et al., *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 29:153-63, **1996**). O gene codificante da nucleosídeo hidrolase de *L. (L.) donovani*, que é um componente do antígeno GP36, foi isolado demonstrando que LdNH recombinante é útil no diagnóstico de calazar em cães uma vez que reage preferencialmente com IgG subtipo 1 de imunoglobulina que é aumentado em cães susceptíveis ao calazar e na doença avançada. (Santana D. M. et al., *Mol. Biochem. Parasitol.*; 120:315-9, **2002**).

A clonagem molecular, caracterização e expressão dos antígenos K9 e K26 (Bathia A. et al., *Mol. Biochem. Parasitol.*; 102:249-261, **1999**), demonstrou que a K26 (proteína hidrofílica de 247 aminoácidos, contendo 11 repetições de 14 aminoácidos, 64% da proteína total) é um marcador diagnóstico altamente específico para avaliar a infecção no soro de indivíduos com leishmaniose visceral.

O antígeno denominado KMP-11 (principal determinante protéico de membrana de protozoários kinetoplastídeos) parece ser antigênico e mostra uma resposta de anticorpos relativamente forte durante o curso natural das leishmanioses e doença de Chagas. A observação de reação imunológica cruzada em infecções causadas por *Leishmania* e *T. cruzi* é particularmente importante, contradizendo estudos que relataram a alta sensibilidade da detecção destes anticorpos em pacientes com leishmaniose. O mapeamento

de determinantes antigênicos em KMP-11 utilizando peptídeos sintéticos revelou a existência predominante de epítomos conformacionais nas infecções de *Leishmania* (Trujillo C. et al., *Immunol. Lett.*; 70:203-9, **1999**).

Um antígeno de *Leishmania chagasi* - LcKin, com homologia à superfamília de proteínas motoras (kinesinas), denominado K39, foi demonstrado como predominante em amastigotos, e contém um domínio repetitivo extenso altamente relacionado entre as espécies de *L. chagasi* e *L. donovani*. Altos títulos de anticorpos foram encontrados para o antígeno rK39, que contém várias repetições de 39 aminoácidos, demonstrando a conservação da região repetitiva entre as espécies mencionadas (Burns J. M. et al., *Proc. Natl. Ac. Sci.*; 90:775-9, **1993**). Com a descoberta deste antígeno, muitos pesquisadores têm testado a sua viabilidade em diferentes testes diagnósticos para a Leishmaniose Visceral, a maioria deles mostrando resultados altamente promissores, na tentativa de utilização de métodos diagnósticos menos invasivos e economicamente viáveis para a população. A detecção de anticorpos IgG para este antígeno tem sido extremamente sensível e específica no diagnóstico da Leishmaniose Visceral, embora seja difícil apontar alguma função protetora para estes anticorpos específicos (Carvalho S. F. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 68:231-324, **2003** e Chang KP et al. *Kinetoplasti. Biol. Dis.*; 1:1, **2002**).

Vários autores apontam a viabilidade de testes diagnósticos utilizando o antígeno rK39 em diferentes metodologias. A especificidade e sensibilidade são na maioria dos casos muito promissoras. Foram testados 228 casos parasitologicamente confirmados utilizando rK39 em ELISA para captura de IgG e teste imunocromatográfico ("dipstick test"), os resultados apontaram 100% de sensibilidade e especificidade para ambos os casos (Singh S. et al., *Clin. Diag. Lab. Immunol.*; 9:568-72, **2002**); resultados similares foram obtidos mostrando a sensibilidade do antígeno rK39 "strip test" e ELISA de 90% e 89%, respectivamente, enquanto a especificidade foi de 100% e 98%, respectivamente (Carvalho S. F. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 68:231-324, **2003**). Foi também analisada a eficácia do antígeno rK39 em Testes de

Aglutinação Direta - DAT (100% de sensibilidade e especificidade) e "dipstick test" com 85,7% de sensibilidade e 82% de especificidade (Schallig H. D.; et al., *Mymensingh Med. J.*; 12:93-7, **2002**).

Análises semelhantes foram feitas para os testes de ELISA (Salotra S. et al., *Methods Enzymol.*; 217:228-57, **2003**; Maalej I. A. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 68:312-20, **2003**; Sreenivas G. et al., *Br. J. Biomed. Sci.*; 59:218-22, **2002**; Braz R. F. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 67:244-348, **2002**; Singh et al., *J. Parasitol.*; 81:1000-3, **1995**; Qu J. Q. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 88:543-5, **1994**; Kumar R. et al., *Clin. Diag. Lab. Immunol.*; 8:1220-4, **2001**; Ozensoy S. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 59:363-9, **1998**; Zijlstra E. E. et al.; *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*; 5:717-20, **1998**; Medrano F. J. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 59:155-62, **1998**; Badaró R et al., *J. Infect. Dis.*; 173:758-61, **1996**).

Muitos autores avaliaram o uso do rK39 utilizando testes imunocromatográficos (Sarker C.B. et al., *Mymensingh Med. J.*; 12:93-7, **2003**; Carvalho S. F. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 68:231-324, **2003**; Boelaert M. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 70:72-7, **2004**; Chappuis F. et al., *Trop. Med. Int. Health.*; 8:277-285, **2003**; Veeken H et al. *Trop. Med. Int. Health.*; 8:164-7, **2003**; Qu J. Q. et al., *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 18:155-8, **2000**; Delgado O. et al., *Parasite*; 8:355-7, **2001**; Berm C. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 63:153-7, **2000** e Zijlstra E. E. et al., *Trop. Med. Int. Health*; 6:108-3, **2001**).

Embora o antígeno tenha sido reportado como satisfatório, resultados variam consideravelmente em diferentes áreas endêmicas, por razões que ainda não são claras, pacientes sudaneses desenvolvem títulos mais baixos de anticorpos anti-rK39 que pacientes indianos, apesar de que o formato do teste possa ser o fator, pois outras marcas de testes imunocromatográficos funcionam melhor nesta região (Sudar S. et al., *Trop. Med. Int. Health*; 12:284-9, **2007** e Titmeijer k. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 12:74-76, **2006**).

Um antígeno de *L. major*, designado LACK (*Leishmania* homologue of receptor for activated C kinase), foi identificado a partir da busca por antígenos reconhecidos por um clone Th1 protetor derivado do baço de camundongo

BALB/c infectado com um extrato solúvel de promastigotos de *L. major*. A sequência de aminoácidos deduzidas deste antígeno tem homologia substancial com os receptores intracelulares para Kinase C ativada (RACKs) e apresenta alta homologia entre *L. major* e *L. chagasi* (Mougneau E. et al., *Science*; 268:245-52, 1995). Tem sido sugerido que a proteína LACK contém um epítipo imunodominante que representa o alvo da resposta imune inicial (Requena J. M. et al., *Parasitol. Today*; 16:246-50, 2000). O antígeno LACK é uma proteína de 36 KDa bem conservada presente em todas as espécies e estágios de desenvolvimento da *Leishmania* e é um dos antígenos mais imunogênicos (Mougneau E. et al., *Science*; 268:245-52, 1995). Este antígeno tem sido usado para avaliar a utilização de vacinas de DNA codificando este e outros antígenos (ex: LmSTI1 e TSA). A combinação desses antígenos tem conferido proteção durável e completa contra o desenvolvimento de lesões cutâneas (Méndez S. et al., *Vaccine*; 31:3702-4, 2002).

Alguns dos antígenos anteriormente descritos são objetos de estudo na busca de vacinas, quimioterápicos ou imunodiagnósticos eficazes das Leishmanioses, sendo objetos das patentes abaixo descritas:

A patente FR2844511 demonstrou o uso de peptídeos de 16 aminoácidos e suas variações para tratamento da leishmaniose e indução da resposta imune Th1 em mamíferos, descreve também a utilização de um kit de diagnóstico contendo um desses peptídeos ou seus derivados ligados a moléculas de biotina ou polilisina acoplados a nitrocelulose ou outros polímeros como membranas, látex ou outros materiais.

A patente WO9711180 e WO0179276 descrevem composições e métodos para prevenção, tratamento e diagnóstico das leishmanioses e estímulo da resposta imune em pacientes utilizando porções imunogênicas dos antígenos M15, Ldp23, Lbhsp83, Lt-210 e Lbelf4A, Lmspla, Lmso9A e MAPS-1 de *Leishmania* ou porções destes e suas variações. Para o mesmo fim, a patente WO2007121184 descreve a utilização de polipeptídeos e proteínas de fusão contendo ao menos uma porção imunogênica de um ou mais antígenos de *Leishmania* e variantes por meio da seleção de regiões protéicas em

“tandem”.

A patente CA2503932 demonstra novas proteínas de *Leishmania major*, as quais compreendem polipeptídeos e polinucleotídeos secretados ou excretados e seus fragmentos funcionais e a utilização destes peptídeos como vacinas e terapêuticos, além da utilização de anticorpos gerados a partir dos mesmos.

A patente WO2007142695 descreve a utilização de um kit de diagnóstico rápido para detecção de formas amastigotas, promastigotas ou proteínas secretadas ou excretadas de *Leishmania*, que pode ser usado no campo levando ao tratamento mais rápido da leishmaniose cutânea, utilizando anticorpos anti- antígeno TSA (Thiol Specific Antigen).

A patente PI0605889-2 demonstra a utilização de antígeno solúvel no diagnóstico da leishmaniose visceral canina através da reação imunoenzimática de ELISA.

A patente US5965142 descreve composições e métodos para o diagnóstico de *Leishmania tropica* utilizando um ou mais epítomos da proteína Lt-210, com potencial uso em vários tipos de imunoenaios pra a detecção deste parasito, podendo tais peptídeos serem utilizados também em composições vacinais.

A patente US2007292847 descreve novas sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos de *Leishmania major* (LmPDE - fosfodiesterases) e anticorpos ligantes a estas sequências para formação de complexos no diagnóstico e tratamento das desordens relacionadas com as doenças causadas por este parasito.

A patente WO9633414 descreve um método de prevenção e de diagnóstico sorológico da infecção por *Leishmania*, por meio de um ou mais polipeptídeos em métodos e kits de diagnóstico para avaliação de amostras individuais de sangue e identificação de indivíduos assintomáticos. Estes polipeptídeos compreendem um epítomo de LcPO (*Leishmania chagasi* homolog of eukariotic acid ribossomal P-protein family) e variantes deste que diferem somente em substituições ou modificações conservativas.

A patente WO2005063803 descreve a utilização de compostos e métodos para a detecção de anticorpos em indivíduos suspeitos de infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, principalmente cepas indianas ou correlacionadas e a utilização de um kit de diagnóstico relacionado; demonstrando o isolamento, caracterização e uso da região imunogênica do gene relacionado a kinesina, isolado da cepa de *Leishmania donovani* MHOM/IN/DD8 e MHOM/IN/KE16/1998 e correlação das sequências dos ácidos nucleicos isolados de cepas indianas e *L. chagasi*.

A patente US7008774 propõe um imunoensaio para detecção de anticorpos do tipo IgM e IgG e detecção de antígenos circulantes em amostras de indivíduos com leishmaniose visceral, cutânea ou canina. Relata também a utilização de um imunoensaio de imuno-captura para detecção de antígenos liberados pelos parasitos.

A patente ES2133236 descreve a utilização de um antígeno recombinante para diagnóstico sorológico da leishmaniose canina utilizando um gene quimérico que codifica antígenos específicos de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b, LiPH2A, LiP0); para tal fim, os fragmentos de DNA dos genes destas proteínas foram adicionados sequencialmente na região 5' do vetor gerando um polipeptídeo com massa molecular de 38K e ponto isoelétrico de 7.37.

A patente WO9639524 descreve métodos e compostos relacionados aos antígenos LbelF4A ou LmelF4A de *Leishmania*, analisando a resposta imune tanto para a proteína como para o antígeno codificado por vacina de DNA.

A patente DE10156679 demonstra a utilização do antígeno p36-LACK na construção de um cassete de expressão para tratamento e composição vacinal para infecções por leishmanias. Da mesma forma, a patente US2004235772 descreve a expressão de DNA utilizando o antígeno p36 LACK para tratamentos de infecções por *Leishmania* assim como vacina correspondente e a patente WO2005039633 demonstra a expressão de DNA para geração de resposta imune utilizando os antígenos p36-LACK, TSA, Kmp-11 e o antígeno gp63 de *Leishmania infantum* ou seus derivados com função correspondente.

A patente WO0181388 relata o uso de políptídeos, proteínas e ácidos nucleicos que contenham no mínimo uma porção da proteína Lip2a (acidic ribosomal protein from *Leishmania infantum*) ou variantes desta para gerar resposta imune em indivíduos ou grupos celulares ou serem utilizadas como agentes terapêuticos para *Leishmania* e como adjuvante para outros parasitos.

A patente WO2007144903 utiliza o antígeno KMP-11 como uma vacina celular híbrida contra leishmanioses, enquanto a patente US2008145385 descreve métodos para imunizar mamíferos infectados com cepas virulentas de *Leishmania* pela administração de uma vacina de DNA do antígeno KMP-11 (Kinetoplastid Membrane Protein-11).

A patente US2008026467 apresenta sequências de DNA capazes de codificar PSAs (Promastigote Surface Antigens) de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* para serem utilizadas em composições vacinais contra *Leishmania*.

A patente US2004170636 descreve a produção de uma vacina de DNA que estimula resposta imune contra infecções por *Leishmania* utilizando o gene A2 de *Leishmania donovani*. A utilização deste antígeno é também base da patente PI0603490-0 que ressalta a sua utilização em vacinas garantindo a diferenciação de animais naturalmente infectados daqueles vacinados. A patente PI0601225-6 também descreve a utilização de antígenos vacinais de espécies diferentes, visando esta discriminação.

A patente WO2006122382 (BRPI0503187) descreve a obtenção de composições vacinais bloqueadoras da transmissão de leishmaniose em humanos e animais a partir de frações de *Leishmania* (Ligante de Fucose-Manose - FML de amastigotas ou promastigotas de *L. donovani*).

A patente WO2006110915 descreve a utilização de uma vacina compreendendo um ou mais antígenos selecionados a partir de um grupo de homólogos de *Leishmania chagasi* ou proteínas hipotéticas de *L. infantum* e proteína do grupo K-39 de *L. infantum*.

A patente WO02072792 demonstra que a utilização das proteínas de *Leishmania* TSA ou MAPS (*Leishmania* thiol-specific thiol-specific antioxidant),

LeIF (*L. braziliensis* gene homologous to the eukaryotic ribosomal protein eIF4A, também chamada de "Lbelf4A"), M15 (*L.* major stress-inducible 1 ou LmSTII) e 6H (*L. braziliensis* gene homologous to the gene for the eukaryotic 83-kDa heat shock protein, também chamada de "Lbhsp83") quando
5 fusionadas a sequências polinucleotídicas heterólogas são capazes de aumentar a expressão de polinucleotídeos heterólogos em células eucarióticas. Estes polipeptídeos de fusão de *Leishmania* isolados ou purificados podem ser utilizados para tratamento ou prevenção de infecções por *Leishmania* ou outros organismos como *M. Tuberculosis*.

10 A patente FR2862313 descreve a construção e isolamento de ácidos nucléicos que codificam uma região imonogênica de formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania*, podendo ser utilizadas em composições vacinais ou para gerar anticorpos e serem utilizados no diagnóstico.

15 A patente FR2826018 descreve o isolamento do gene codificante da proteína LmPDI, que possuiu duas regiões com sequências idênticas (Cys-Gly-His-Cys) reconhecidas como alvo terapêutico para o desenvolvimento de medicamentos e um novo elemento para composição de vacinas contra *Leishmania* para humanos e animais.

20 A tecnologia de "Phage Display" ou exposição de biomoléculas em fagos tem apresentado uma utilização cada vez mais crescente em diversas áreas das ciências desde que descrita no ano de 1985 (Smith G. P. *Science* 228:1315-17, 1985). Este autor foi o pioneiro a conseguir a expressão da enzima de restrição *Eco* RI como uma fusão da proteína três (pIII) do capsídeo viral.

25 Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas usando o pilus sexual como receptor. As partículas de fagos filamentosos (linhagens M13, f1 e fd), que infectam *E. coli* via pilus F consiste de um DNA de fita simples incluso em uma cápsula protéica. Um fago viável expressa aproximadamente 2.700 cópias da proteína
30 gene 8 (g8 ou pVIII, uma proteína de 50 resíduos de aminoácidos) e 3 a 5 cópias do gene III (p3p ou pIII) proteína de 406 aminoácidos (Russel M., *Mol.*

Microbiol.; 5:1607-13, **1991**).

Em sistemas onde todas as pIII ou pVIII são utilizadas, o tamanho da proteína inserida no vetor é limitado, pois grandes proteínas interferem nas funções das proteínas do capsídeo, tornando o fago pouco infectivo. Este sistema "Phage display" foi criado para a exposição de bibliotecas de pequenos peptídeos (no máximo 30 aminoácidos) (Phizicky E.M. Fields S., *Microbiol. Rev.*; 59:94-123, **1995**).

A exposição em fagos filamentosos é baseada na clonagem de fragmentos de DNA codificantes de milhões de variantes de certos ligantes (Benhar I. *Biotechnol. Adv.*; 19:1-33, **2001**), como proteínas, incluindo anticorpos, ou peptídeos. As seqüências de DNA de interesse são inseridas em uma localização no genoma de bacteriófagos filamentosos, de modo que a proteína codificada é expressa na superfície do fago filamentoso como um produto de fusão a uma das proteínas da superfície do fago (Azzay H. M. E. et al. *Clin. Biochem.*; 35:425-45, **2002**).

A conexão entre genótipo e fenótipo, permite o enriquecimento de fagos específicos, como por exemplo, utilizando a seleção em um alvo imobilizado (Benhar I. *Biotchno. Adv.*; 19:1-33, **2001**).

O "Biopanning" ou procedimento de seleção é feito pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. Na maioria das vezes, o alvo é retido em placas de ELISA, mas também se utiliza "beads", resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas, e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O "pool" de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica ou "biopanning" (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com seqüências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens, os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA, "Western Blot" ou ELISA (Smith G. P. *Science*; 228:1315-17, **1985**).

Como alternativa ao "panning" contra um alvo imobilizado em uma superfície, a biblioteca pode reagir com um alvo em solução, dada pela

afinidade de captura do complexo alvo-fago em uma matriz de afinidade ("bead") específica para a proteína alvo. O experimento requer substancialmente menos alvo por experimento que o "panning" em superfície, podendo resultar em uma maior acessibilidade do sítio ligante para os peptídeos expressos nos fagos, assim como evitar a desnaturação parcial do alvo na superfície plástica (Barbas, C. et al., *Cold Spr. Har. Lab. Press*, NY; **2001**).

Oligonucleotídeos sintéticos com um comprimento constante, mas com códons não especificados, randomizados por mutagênese sítio-dirigida, usando deoxinucleotídeos degenerados, são clonados como fusão a uma das proteínas do capsídeo de fagos M13, onde são expressos como proteínas de fusão ligadas ao capsídeo. Peptídeos ligados aos fagos exibem um grande potencial mimético a epítomos lineares, conformacionais ou não protéicos (Smith G. P. *Curr. Opin. Biotechnol.*; 2:668-73, **1991**; Smith G. P. et al., *Gene*, 128:37-42, **1993**).

Bibliotecas de peptídeos fusionadas em fagos têm sido muito utilizadas no estudo das interações entre antígenos e anticorpos (Cortese R. et al., *Trends Biotechnol.*; 12:262-7, **1994**; Birch-Marchin I. et al., *J. Virol. Methods*; 88:89-104, **2000**; Christopher G. et al. *Infect. Immunol.*; 67:4679-88, **1999**), estes trabalhos demonstram a obtenção de peptídeos específicos pela seleção das bibliotecas de fagos com anticorpos monoclonais e policlonais, epítomos lineares, tanto quanto mimetopos, os que imitam antígenos lineares, descontínuos, conformacionais e até mesmo epítomos não peptídicos de antígenos.

Peptídeos selecionados contra um alvo particular que tem sequência similar têm um papel na identificação do motivo necessário para ligação (Stephen C. W. et al., *J. Mol. Biol.*; 225:577-83, **1992**). Nos casos em que os peptídeos selecionados se assemelham ao peptídeo ligante natural, são denominados mimetopos (Geysen H. M. et al., *Mol. Immunol.*; 23:709-715, **1986**; Salotra Smith G. P. et al., *Methods Enzymol.*; 217:228-57, **1993**). Sequências peptídicas identificadas por "Phage Display" têm sido mostradas

como agonistas ou antagonistas de receptores (Doobar J. Winter G. J., *Mol. Biol.*; 244:361-9, **1994**).

Peptídeos que neutralizam imunoglobulinas podem ser empregados como reagentes diagnósticos ou usados como agentes terapêuticos controlando doenças autoimunes (Blank M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 96:5164-68, **1999**). Bibliotecas de peptídeos randômicos podem ser usadas para mapear epítomos de anticorpos policlonais e monoclonais, identificando peptídeos ligantes, e desenvolvendo fagos que definem sítios para diferentes enzimas (Mattheus D. J. et al., *Science*, 260:1113-7, **1993**; Ohkubo et al., *Comb. Chem. High Throughput Screen.*; 4:573-83, **2001**).

Fagos que expressam epítomos ou mimetopos podem emergir como uma ferramenta útil para o desenvolvimento de vacinas efetivas ou podem servir como veículos de entrega de vacinas por si próprios (Benhar I. *Biotechnol. Adv.*; 19:1-33, **2001**).

A apresentação de pequenos peptídeos na superfície de partículas virais pode aumentar sua imunogenicidade e conseqüentemente seu potencial como candidatos a vacinas. A resposta imunogênica a fagos M13 é dependente de células T e não requer adjuvante (Azzay H. M. E. et al., *Clin. Biochem.*; 35:425-45, **2002**).

Até o presente momento, não existem evidências na literatura revelando experimentos utilizando a técnica de "Phage Display" no estudo das interações antígeno-anticorpo com o protozoário *Leishmania*. Entretanto, vários autores relatam a utilização desta técnica no entendimento de doenças provocadas por vírus, bactérias, protozoários e a interação entre seus antígenos e a resposta imune do hospedeiro, buscando o mapeamento de epítomos ou desenvolvimento de vacinas para: *Plasmodium falciparum* (de la Cruz V. F. et al., *J. Biol. Chem.*; 263:4318-22, **1988**; Willis A. E. et al., *Gene*, 128:79-83, **1993**), *Taenia solium* (Gazarian K. G. et al., *Immunol. Lett.*; 42:191-5, **2000**), Vírus da Doença Infecciosa da Bursa (Cui X. et al., *J. Virol. Methods*; 109:75-83, **2003**), *Eimeria tenella* (Abi-Ghanem D. et al., *Vet. Immunol. Immunophatol.*; 121:58-67, **2008**), *Echinococcus granulosus* (Read A. J. et al., *J. Chromatogr.*

B.; 877:1516-22) e neurocisticercose humana (Hell R. C. R. et al., *Clin. Immunol.*; 13:129-38, **2009**) dentre outros.

Várias patentes demonstram a utilização da tecnologia de “Phage Display” no estudo de doenças parasitárias tais como as patentes: 5 US2007281302 (peptídeos ligantes às bactérias: *B. anthracis*, *B. subtilis* e *B. cereus* e uso destes para detecção de esporos de *B. anthracis*); US2007141076 (identificação de fragmentos antigênicos de proteínas de *Toxoplasma gondii* e seu uso no diagnóstico e como agente imunogênico); 10 CN101015691 (desenvolvimento de uma vacina universal em microesferas contra o tipo B do vírus Infuenza por meio da inserção a região M2 do vírus no bacteriófago T7); WO2006071896 (vacina para a síndrome respiratória aguda grave (SARS), compreendendo epítomos antigênicos do vírus) e US2006094017 (descoberta de mimetopos específicos para a proteína gp120 do vírus HIV e utilização destes como conjugados imunológicos na vacinação 15 contra o vírus e também como ferramentas de diagnóstico).

Dada a viabilidade da tecnologia acima descrita, torna-se importante ressaltar que essa técnica complementa a atual tendência dos projetos genômicos, na qual se gera um grande volume de informação, mas com pouca descrição fenotípica. Com a técnica de apresentação em fagos, podemos 20 agora testar genes de interesse em grande escala, na busca de um conjunto de proteínas que interagem, e que vem sendo chamado de “interatoma”. A busca desses “interatomas” promete expandir os limites criados com os projetos genômicos e permite inferir como esses genes se relacionam, explicando o indivíduo fenotipicamente (Brígido M. M. *Bioteχνologia Ciência e 25 Desenvolvimento*; 26:44-51, **2002**).

Metodologias para o uso desta técnica na expressão de polipeptídeos recombinantes e aprimoramento da tecnologia foram descritas nas patentes: KR20070041966 (método para exposição de anticorpos fusionados a proteína pIII na superfície de fago recombinante com maior estabilidade e 30 praticabilidade); US2009105090 (uso de proteína pIII mutante com inserção de aminoácido para promover uma mudança na conformação do peptídeo);

WO9958655 (utilização de bacteriófago que expressa polipeptídeos heterólogos portadores de um sítio de clivagem dentro do peptídeo expresso que possibilita a propagação da proteína de fusão intacta); WO2009024591 (alternativa de exposição em fagos utilizando a proteína pVII e kit de comercialização do mesmo); US7083945 (expressão de proteínas em forma solúvel para interação com ligantes marcados), US2006068421 (vetores de expressão e novos métodos de expressão que permitem a eficiente seleção e seleção de polipeptídeos), US2005202512 (métodos para a seleção de população de polipeptídeos funcionais), GB2408332 (métodos de ligação específicos para antígenos de superfície celular), US2003104604 (propõe o aumento da eficiência da técnica, por meio de expressão em bactérias), EP1452599 (bibliotecas que expressam fagos com vários peptídeos ou proteínas mutantes capazes de se ligarem a materiais de interesse) e US2006035223 (peptídeos com capacidade de ligação a materiais inorgânicos como sílica, cobalto, ferro ou óxidos) nas quais são propostas metodologias que aperfeiçoam a técnica.

A presente invenção utilizou a tecnologia de "Phage Display" para a identificação e seleção de peptídeos específicos e motivos proteicos relacionados aos parasitos de gênero *Leishmania*, determinando epítomos funcionais de proteínas envolvidas na resposta imune contra o parasito para o uso em plataformas para um diagnóstico mais preciso e composições vacinais preventivas e/ou terapêuticas contra as leishmanioses buscando maior especificidade devido a utilização de sítios específicos dos antígenos.

Os exemplos a seguir mostram uma descrição detalhada dos resultados experimentais obtidos possibilitando a melhor compreensão da presente invenção. Os procedimentos experimentais envolvidos serão detalhados no final desse relatório descritivo. A metodologia empregada para a seleção, caracterização e utilização de peptídeos recombinantes e motivos protéicos que mimetizam regiões antigênicas de *Leishmania* poderá ser aplicada a outros protozoários.

A invenção poderá ser melhor compreendida por meio da descrição

detalhada, em consonância com as Figuras em anexo, onde:

A FIGURA 1 apresenta o ensaio de “dot-blot” realizado para os peptídeos recombinantes selecionados nas eluições específicas frente anticorpos de pacientes portadores de Leishmaniose Visceral (V) e também de
5 Leishmaniose Tegumentar (T) e controles saudáveis (N).

A FIGURA 2 apresenta o ensaio de “dot-blot” competitivo para os clones de maior relevância na seleção específica para Leishmaniose Visceral, os anticorpos de pacientes acometidos pela doença foram pré-incubados com antígeno total de *Leishmania chagasi*, podendo assim mostrar a que os
10 peptídeos recombinantes e o antígeno natural competem pelos mesmos sítios de ligação nos anticorpos.

Exemplo 1:

Este exemplo se refere à seleção e caracterização dos peptídeos recombinantes miméticos seus motivos protéicos e sequências inversas
15 objetos desta invenção que foram selecionados a partir de anticorpos de pacientes acometidos pela Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar, independentemente. Foram realizadas seleções abrangentes e específicas para cada uma das patologias acima relacionadas.

A TABELA 1 apresenta a identidade das seqüências objetos desta
20 invenção, designadas por Seq. ID N^o 1 a Seq. ID N^o 56 (seqüências normais) e Seq. ID N^o 57 a Seq. ID N^o 112 (seqüências invertidas) que referem-se aos experimentos realizados frente a anticorpos de pacientes com Leishmaniose Visceral e as frequências observadas para cada uma destas sequências em cada um dos processos de seleção.

25 Três tipos de eluição foram utilizados para a seleção destes peptídeos recombinantes, visando uma seleção abrangente (eluição ácida) e duas mais específicas (antígeno recombinante ou antígeno total), todas tendo como alvo ligantes anticorpos do tipo IgG de pacientes acometidos pela Leishmaniose Visceral, sendo tais eluições:

30 A Eluição Ácida (Seleção Tipo 1), representada pelas seqüências Seq.

ID Nº 1 a Seq. ID Nº 24 e seus correspondentes invertidos Seq. ID Nº 57 a Seq. ID Nº 80; a seleção apresentou um número total de 28 clones, sendo 24 deles distintos entre si, o clone representado pelas seqüências Seq. ID Nº 14 - Seq. ID Nº 70 apresentou a maior freqüência nesta seleção (10,71%), seguido pelos clones de seqüências representados por Seq. ID Nº 3 - Seq. ID Nº 59 e Seq. ID Nº 19 - Seq. ID Nº 75 com representatividade intermediária (7,14%), as demais seqüências foram únicas na população aqui apresentada.

A Eluição Específica frente ao antígeno recombinante rK39 (Seleção Tipo 2), representada pelas seqüências Seq. ID Nº 25 a Seq. ID Nº 42 e seus correspondentes invertidos Seq. ID Nº 81 a Seq. ID Nº 98; a seleção apresentou um total de 30 clones, 18 deles distintos entre si, o clone representado pelas seqüências Seq. ID Nº 34 - Seq. ID Nº 90 mostrou a maior freqüência na população (20,0%), seguido pelos clones Seq. ID Nº 25 - Seq. ID Nº 81 (16,67%), Seq. ID Nº 31 - Seq. ID Nº 87 (10,0%) e Seq. ID Nº 28 - Seq. ID Nº 84 (6,67%).

A Eluição Específica realizada frente a antígenos totais de *Leishmania chagasi* (Seleção Tipo 3), tendo como representantes as seqüências enumeradas Seq. ID Nº 43 a Seq. ID Nº 56 com seus correspondentes invertidos designados de Seq. ID Nº 100 a Seq. ID Nº 112. A população é representada por 29 clones, tendo 15 deles seqüências distintas entre si. O clone mais freqüente nesta população é o representado pelas seqüências Seq. ID Nº 43 - Seq. ID Nº 99 (31,03%), seguido pelos de seqüências Seq. ID Nº 52 - Seq. ID Nº 118 (20,69%) e Seq. ID Nº 4 - Seq. ID Nº 60 (6,90%). As demais seqüências obtidas nesta seleção tiveram uma freqüência de 3,45% dos clones.

TABELA 1

Peptídeos	Peptídeos invertidos correspondentes	Freqüência (%)
Seleção Tipo 1 – Eluição Ácida – 28 clones		
Seq. ID Nº 1	Seq. ID Nº 57	3,57
Seq. ID Nº 2	Seq. ID Nº 58	3,57
Seq. ID Nº 3	Seq. ID Nº 59	7,14

Continuação da Tabela 1

Seq. ID N ^o 4	Seq. ID N ^o 60	3,57
Seq. ID N ^o 5	Seq. ID N ^o 61	3,57
Seq. ID N ^o 6	Seq. ID N ^o 62	3,57
Seq. ID N ^o 7	Seq. ID N ^o 63	3,57
Seq. ID N ^o 8	Seq. ID N ^o 64	3,57
Seq. ID N ^o 9	Seq. ID N ^o 65	3,57
Seq. ID N ^o 10	Seq. ID N ^o 66	3,57
Seq. ID N ^o 11	Seq. ID N ^o 67	3,57
Seq. ID N ^o 12	Seq. ID N ^o 68	3,57
Seq. ID N ^o 13	Seq. ID N ^o 69	3,57
Seq. ID N ^o 14	Seq. ID N ^o 70	10,71
Seq. ID N ^o 15	Seq. ID N ^o 71	3,57
Seq. ID N ^o 16	Seq. ID N ^o 72	3,57
Seq. ID N ^o 17	Seq. ID N ^o 73	3,57
Seq. ID N ^o 18	Seq. ID N ^o 74	3,57
Seq. ID N ^o 19	Seq. ID N ^o 75	7,14
Seq. ID N ^o 20	Seq. ID N ^o 76	3,57
Seq. ID N ^o 21	Seq. ID N ^o 77	3,57
Seq. ID N ^o 22	Seq. ID N ^o 78	3,57
Seq. ID N ^o 23	Seq. ID N ^o 79	3,57
Seq. ID N ^o 24	Seq. ID N ^o 80	3,57

Seleção Tipo 2 – Eluição Específica com antígeno rK39 - 30 clones

Seq. ID N ^o 25	Seq. ID N ^o 81	16,67
Seq. ID N ^o 26	Seq. ID N ^o 82	3,33
Seq. ID N ^o 27	Seq. ID N ^o 83	3,33
Seq. ID N ^o 28	Seq. ID N ^o 84	6,67
Seq. ID N ^o 29	Seq. ID N ^o 85	3,33
Seq. ID N ^o 30	Seq. ID N ^o 86	3,33
Seq. ID N ^o 31	Seq. ID N ^o 87	10,0
Seq. ID N ^o 32	Seq. ID N ^o 88	3,33
Seq. ID N ^o 33	Seq. ID N ^o 89	3,33
Seq. ID N ^o 34	Seq. ID N ^o 90	20,0
Seq. ID N ^o 35	Seq. ID N ^o 91	3,33
Seq. ID N ^o 36	Seq. ID N ^o 92	3,33
Seq. ID N ^o 37	Seq. ID N ^o 93	3,33
Seq. ID N ^o 38	Seq. ID N ^o 94	3,33
Seq. ID N ^o 39	Seq. ID N ^o 95	3,33

Continuação da Tabela 1

Seq. ID N ^o 40	Seq. ID N ^o 96	3,33
Seq. ID N ^o 41	Seq. ID N ^o 97	3,33
Seq. ID N ^o 42	Seq. ID N ^o 98	3,33
Seleção Tipo 3 - Eluição Específica Antígeno total de <i>Leishmania</i>		
<i>Chagasi</i> - 29 clones		
Seq. ID N ^o 43	Seq. ID N ^o 99	31,03
Seq. ID N ^o 4	Seq. ID N ^o 60	6,9
Seq. ID N ^o 44	Seq. ID N ^o 100	3,45
Seq. ID N ^o 45	Seq. ID N ^o 101	3,45
Seq. ID N ^o 46	Seq. ID N ^o 102	3,45
Seq. ID N ^o 47	Seq. ID N ^o 103	3,45
Seq. ID N ^o 48	Seq. ID N ^o 104	3,45
Seq. ID N ^o 49	Seq. ID N ^o 105	3,45
Seq. ID N ^o 50	Seq. ID N ^o 106	3,45
Seq. ID N ^o 51	Seq. ID N ^o 107	3,45
Seq. ID N ^o 52	Seq. ID N ^o 118	20,69
Seq. ID N ^o 53	Seq. ID N ^o 109	3,45
Seq. ID N ^o 54	Seq. ID N ^o 110	3,45
Seq. ID N ^o 55	Seq. ID N ^o 111	3,45
Seq. ID N ^o 56	Seq. ID N ^o 112	3,45

O alinhamento das sequências apresentadas na Seleção Tipo 1 mostrou a existência de 3 motivos particulares repetidos dentre os clones (consensos), podendo representar epítomos que são representados pelas seguintes sequências e suas respectivas sequências invertidas: Seq. ID N^o 165 (Seq. ID N^o 166), Seq. ID N^o 167 (Seq. ID N^o 168) e Seq. ID N^o 169 (Seq. ID N^o 170).

Em virtude da representação conservada em determinadas regiões ao longo dos peptídeos, os motivos podem apontar importantes epítomos contínuos ou descontínuos dos antígenos, como exemplificado na TABELA 2, que apresenta o alinhamento dos clones e as sequências consenso obtidas nos diferentes tipos de seleções realizadas contra anticorpos de pacientes com Leishmaniose Visceral, onde: **A**: Eluição Ácida, **B**: Eluição específica com o antígeno rK39 e **C**: Eluição específica com antígeno total de *L. chagasi*. Em destaque, as sequências consenso identificadas entre os clones.

TABELA 2

A	
Seq. ID N ^o 1/57	---AFTDKASARPKA-----
Seq. ID N ^o 17/73	-SVSVGMKPSRP-----
Seq. ID N ^o 7/63	-----ATPRSMHPLPDL
Seq. ID N ^o 8/64	-----ATPRSMIAPPTA
Seq. ID N ^o 20/76	-----TTPRSEIPYPII
Seq. ID N ^o 9/65	-----ATPRSSLPQSQI
Seq. ID N ^o 10/66	-----ATPRSVHSTAQP
Seq. ID N ^o 23/79	-----YAATPRSHLTEL--
Seq. ID N ^o 12/68	-----YAATPRSHLTGP--
Seq. ID N ^o 5/61	-----ATPRSHMLASSS
Seq. ID N ^o 6/62	-----ATPRSLSTVISI
Seq. ID N ^o 4/60	-----ATPDRSRIESRL
Seq. ID N ^o 3/59	-----ATLRNWIPPSST
Seq. ID N ^o 22/78	-----VQSATLRNWIAS---
Seq. ID N ^o 16/72	-----PNAATLRTLKQI---
Seq. ID N ^o 19/75	-----TSAATMRLKSD---
Seq. ID N ^o 18/74	TPSSASSVATLR-----
Seq. ID N ^o 13/69	---HKLAGLNLRDHL-----
Seq. ID N ^o 14/70	---HKLAGLNLRDQL-----
Seq. ID N ^o 12/68	-GLHKLAGLNLR-----
Seq. ID N ^o 11/67	-----FALKEDAQSSLS-
Seq. ID N ^o 2/58	-----ATEAHPTTLARK
Seq. ID N ^o 15/71	----LPMHESPKRDP----
Seq. ID N ^o 21/77	--VCFCGYETESQE-----
B	
Seq. ID N ^o 31/87	----GTPRSQIQYAAP-
Seq. ID N ^o 33/89	----ITPRSNQATYLL-
Seq. ID N ^o 32/88	----VTPRSLNVDPSR-
Seq. ID N ^o 29/85	--TTTLTRSLPLIH---
Seq. ID N ^o 36/92	--HHFTHISLPLVR---
Seq. ID N ^o 42/98	----ASPRSSFLEKA-
Seq. ID N ^o 39/95	--SFHLPREWHASP---
Seq. ID N ^o 30/86	NLDTRTWLSLYT-----
Seq. ID N ^o 34/90	---ATPQRNSILVQS--
Seq. ID N ^o 37/93	----ATQRNAYPSGPH-
Seq. ID N ^o 35/91	YASANTSRTIYT-----
Seq. ID N ^o 26/92	--EKSSGTS ^U SLHGVP---
Seq. ID N ^o 25/81	---LTQKFSGIDIKR--
Seq. ID N ^o 28/84	---IGTAPMLFAGYR--
Seq. ID N ^o 38/94	-INHSTAESRYFM----
Seq. ID N ^o 41/97	-----INPSYHPFRMPA
Seq. ID N ^o 40/96	----MNAGSNAFSCLT-
Seq. ID N ^o 27/83	----VVTRYNDNIRHS-

Continuação da Tabela 1

	C
Seq. ID N ^o 43/99	-----ATPRSIHDSETL-
Seq. ID N ^o 54/110	-----ATPRSIHGFWR-
Seq. ID N ^o 48/104	-----ATIRNIQTFFPMV-
Seq. ID N ^o 46/102	----SDWTTMRAFRIT----
Seq. ID N ^o 50/106	-----ATPRRFMILRPL-
Seq. ID N ^o 49/105	-----SATVTIKRLQYT--
Seq. ID N ^o 45/101	----HMSHQDPDVRQLQ----
Seq. ID N ^o 51/107	-----TPFMKTVLLTSA
Seq. ID N ^o 55/111	GKAPTITALPQA-----
Seq. ID N ^o 56/112	-----GTAIRNAQVPLH---
Seq. ID N ^o 52/108	---YPTKASGNDLRG-----
Seq. ID N ^o 46/105	-SLLNLFVTSPAV-----
Seq. ID N ^o 53/109	-YDLNVHYLPPKP-----
Seq. ID N ^o 44/100	---LSPHALEKDRFV-----

O alinhamento destes consensos com proteínas restritas de *Leishmania chagasi* em banco do GeneBank (BLAST - Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) mostrou homologia parcial com proteínas relevantes de *Leishmania* tais como K39, GP63, GP46 e o antígeno LACK dentre outras, o que é demonstrado na TABELA 3, que apresenta as sequências consenso e as proteínas a que se relacionam com seus números de acesso, bem como a similaridade dada pelos aminoácidos representativos do alinhamento, sua posição na proteína original e números de "Score" e "EValue" para o alinhamento em questão.

Os experimentos com Eluições Específicas (Seleção Tipo 2 e 3) puderam confirmar a relevância do consenso representado pela sequência Seq. ID N^o 167 (Seq. ID N^o 168); mesmo com o aumento da especificidade da eluição, estes peptídeos consenso mantiveram uma frequência considerável na população de clones seqüenciados. A presença de motivos protéicos pode ser relacionada com a seleção a favor do ligante, pela indicação de que estes aminoácidos poderiam ser cruciais para o reconhecimento dos peptídeos pelo paratopo.

Apresentam similaridades com a sequência consenso identificada como Seq. ID N^o 165 (Seq. ID N^o 166) as seqüências de peptídeos seguintes e suas

respectivas sequências invertidas: Seq. ID Nº 12 (Seq. ID Nº 68), Seq. ID Nº 13 (Seq. ID Nº 69) e Seq. ID Nº 14 (Seq. ID Nº 70).

TABELA 3

Consenso	Proteínas	Similaridade
Seq. ID Nº 165	gi 422266 pir A47334 K39 - LcKin - Antígeno tipo kinesina [<i>Leishmania chagasi</i>] (fragmento). (Burns J. M. et al., <i>Proc. Nat. Ac. Sci.</i> ; 90:775-9, 1993).	K+ LNLR 497-504 (16.8/2.3)
	gi 2232357 gb AAB62271.1 GP46 - Proteína de superfície de membrana [<i>Leishmania donovani chagasi</i>]. (Beetham J. K. et al.; <i>Bio. Chem.</i> ; 272:17360-66, 1997).	LA L+LR 184-190 (15.5/5.6)
	gi 38146297 gb AAR11511.1 GP46 - Antígeno de superfície de promastigoto [<i>Leishmania donovani chagasi</i>]. (Beetham J. K. et al.; <i>Bio. Chem.</i> ; 272:17360-66, 1997).	LA LNL 304-309 (15.5/5.6)
	gi 44889435 gb AAS48353.1 Nucleosídeo hidrolase não-específico [<i>Leishmania donovani chagasi</i>]. (Santana D. M. et al., <i>Mo. Biochem. Parasitol.</i> ; 120:315-19, 2002).	GLNL 190-193 (15.1/7.5)
	gi 5852143 emb CAB55505.1 Molécula tipo Kinesina [<i>Leishmania major</i>]. (Ivens A. C. et al., <i>Genome Res.</i> ; 8:135-45, 1998).	LAGL 1279-1282 (14.2/14)
Seq. ID Nº 166	gi 308890 gb AAA53687.1 Proteína gp63 - Glicoproteína 63 - Leishmanolisina [<i>Leishmania chagasi</i>]. (Roberts S. C. et al.; <i>Mol. Bioch. Parasitol.</i> ; 62:157-71, 1993).	RL+LGA 416-420 (17.6/1.3)
	gi 22121984 gb AAM88576.1 dhfr-ts [<i>Leishmania donovani chagasi</i>]	GALK 470-473 (14.2/14)
	gi 5852143 emb CAB55505.1 Molécula tipo kinesina [<i>Leishmania major</i>]. (Ivens A. C. et al., <i>Genome Res.</i> ; 8:135-45, 1998).	NL AL 733-737 (14.2/14)
	gi 38146297 gb AAR11511.1 GP46 - Antígeno de superfície de membrana [<i>Leishmania donovani chagasi</i>]. (Lincoln L. M. et al.; <i>Mol. Biochem. Parasitol.</i> 137:185-9, 2004).	RL L AL 399-405 (13.4/24)
	gi 6453822 gb AAC05295.2 DNA topoisomerase II [<i>Leishmania chagasi</i>]	NL LK 476-481 (9.5/345)
Seq. ID Nº 167	gi 1276475 gb AAA97576.1 LACK - Antígeno LACK. (Mougneau E. et al.; <i>Science</i> 268:563-6, 1995).	AT RS 253-257 (12.5/24)
Seq. ID Nº 168	Nenhuma similaridade	-
Seq. ID Nº 169	Nenhuma similaridade	-
Seq. ID Nº 170	Nenhuma similaridade	-

A principal proteína a qual esta sequência consenso se relaciona quando em posição normal é a K39 de *Leishmania chagasi* relacionada à superfamília Kinesina de proteínas motoras; a proteína recombinante rK39

aponta altos títulos de anticorpos em pacientes com Leishmaniose Visceral, o que pode justificar o sucesso da seleção realizada. O resíduo de aminoácidos aqui apontado encontra-se em região distinta à do antígeno recombinante, podendo apontar um novo epítopo e ser ferramenta útil no desenvolvimento de novas tecnologias de imunodiagnóstico e profilaxia. Outra proteína de relevância relacionada ao consenso em duas posições é a GP46 - glicoproteína de 46 KDa presente na superfície das formas promastigotas da maioria das espécies de *Leishmania* - que apresenta elevados níveis de RNA mensageiro nas formas promastigotas infecciosas, a presença desta sequência consenso relacionada a esta proteína pode ser um indício da participação da proteína na resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito e possuir também grande valor diagnóstico. Quando invertida, esta sequência consenso relaciona-se com as seguintes proteínas de *Leishmania*: Proteína gp63, dhfr-ts (*Leishmania donovani chagasi*), Molécula tipo kinesina de *Leishmania major* e GP46 - Antígeno de superfície de membrana (*Leishmania donovani chagasi*).

Apresentam similaridade com a sequência consenso identificada pelas seqüências Seq. ID N^o 167 e sua respectiva sequência invertida Seq. ID N^o 168, com homologia total ou parcial ao consenso as seguintes seqüências para a **Seleção Tipo 1**: Seq. ID N^o 4 (Seq. ID N^o 60), Seq. ID N^o 5 (Seq. ID N^o 61), Seq. ID N^o 6 (Seq. ID N^o 62), Seq. ID N^o 7 (Seq. ID N^o 63), Seq. ID N^o 8 (Seq. ID N^o 64), Seq. ID N^o 9 (Seq. ID N^o 65), Seq. ID N^o 10 (Seq. ID N^o 66), Seq. ID N^o 12 (Seq. ID N^o 68), Seq. ID N^o 20 (Seq. ID N^o 76) e Seq. ID N^o 23 (Seq. ID N^o 79) e Seq. ID N^o 29 (Seq. ID N^o 85); para a **Seleção Tipo 2**: Seq. ID N^o 31 (Seq. ID N^o 87), Seq. ID N^o 32 (Seq. ID N^o 88), Seq. ID N^o 33 (Seq. ID N^o 89), Seq. ID N^o 34 (Seq. ID N^o 90) e Seq. ID N^o 35 (Seq. ID N^o 90) e para a **Seleção Tipo 3**: Seq. ID N^o 37 (Seq. ID N^o 93), Seq. ID N^o 42 (Seq. ID N^o 98), Seq. ID N^o 38 (Seq. ID N^o 94), Seq. ID N^o 43 (Seq. ID N^o 99), Seq. ID N^o 44 (Seq. ID N^o 100) e Seq. ID N^o 48 (Seq. ID N^o 104).

Esta sequência consenso quando em posição normal se relaciona com o antígeno LACK com homologia parcial, este antígeno é uma proteína de 36 KDa bem conservada presente em todas as espécies e estágios de

desenvolvimento de *Leishmania* sendo um dos antígenos mais imunogênicos. A presença desta sequência em muitos dos clones objetos desta invenção leva a designação de um epítipo dentro desta proteína com valor no diagnóstico e profilaxia das doenças tanto no homem como em animais. Quando em posição invertida esta sequência consenso não mostra homologia com as proteínas depositadas em banco de dados.

A sequência consenso identificada pela seqüência Seq. ID N° 169 (Seq. ID N° 170) tem as seqüências Seq. ID N° 3 (Seq. ID N° 59), Seq. ID N° 22 (Seq. ID N° 78), Seq. ID N° 16 (Seq. ID N° 72), Seq. ID N° 19 (Seq. ID N° 75), Seq. ID N° 18 (Seq. ID N° 74) como representantes portadoras do consenso e não apresentaram homologia nos alinhamentos realizados em bancos de dados.

A TABELA 4 apresenta as seqüências identificadas por Seq. ID N° 113 a Seq. ID N° 138 (seqüências normais) e Seq. ID N° 139 a Seq. ID N° 164 (seqüências invertidas) que referem-se às seleções realizadas frente a anticorpos de pacientes com Leishmaniose Tegumentar, mostrando também a frequência observada de cada seqüência peptídica para cada um dos processos de seleção.

Para anticorpos de pacientes com Leishmaniose Tegumentar foram realizados dois processos de seleção sendo eles:

- Eluição Ácida (Seleção Tipo 1) representada pelos clones de seqüências Seq. ID N° 113 a Seq. ID N° 124 e seus correspondentes invertidos Seq. ID N° 139 a Seq. ID N° 150 com um total de 12 clones cada um representando 8,33% da população.

- Eluição Específica (Seleção Tipo 2) realizada frente a antígenos totais de *Leishmania amazonensis*, representados pelas seqüências Seq. ID N° 125 a Seq. ID N° 138 e seus correspondentes invertidos Seq. ID N° 151 a Seq. ID N° 164, com um total de 14 novos clones. O clone mais frequente dentre eles é o representado pelas seqüências identificadas por Seq. ID N° 119 - Seq. ID N° 145 (16,67%), seguido pelos clones de seqüências Seq. ID N° 114 - Seq. ID N° 140, Seq. ID N° 118 - Seq. ID N° 144 e Seq. ID N° 129 - Seq. ID N° 155

(8,33%), Seq. ID N^o 124 - Seq. ID N^o 150, Seq. ID N^o 125 - Seq. ID N^o 151, Seq. ID N^o 126 - Seq. ID N^o 152 e Seq. ID N^o 137 - Seq. ID N^o 163 (5,56%) e os demais com 2,78%.

TABELA 4

Peptídeos	Peptídeos invertidos correspondentes	Frequência (%)
Seleção Tipo 1 – Eluição Ácida – 12 clones		
Seq. ID N ^o 113	Seq. ID N ^o 139	8,33%
Seq. ID N ^o 114	Seq. ID N ^o 140	8,33%
Seq. ID N ^o 115	Seq. ID N ^o 141	8,33%
Seq. ID N ^o 116	Seq. ID N ^o 142	8,33%
Seq. ID N ^o 117	Seq. ID N ^o 143	8,33%
Seq. ID N ^o 118	Seq. ID N ^o 144	8,33%
Seq. ID N ^o 119	Seq. ID N ^o 145	8,33%
Seq. ID N ^o 120	Seq. ID N ^o 146	8,33%
Seq. ID N ^o 121	Seq. ID N ^o 147	8,33%
Seq. ID N ^o 122	Seq. ID N ^o 148	8,33%
Seq. ID N ^o 123	Seq. ID N ^o 149	8,33%
Seq. ID N ^o 124	Seq. ID N ^o 150	8,33%
Seleção Tipo 2 – Eluição Específica – 14 clones		
Seq. ID N ^o 114	Seq. ID N ^o 140	8,33%
Seq. ID N ^o 118	Seq. ID N ^o 144	8,33%
Seq. ID N ^o 119	Seq. ID N ^o 145	16,67%
Seq. ID N ^o 121	Seq. ID N ^o 147	2,78%
Seq. ID N ^o 122	Seq. ID N ^o 148	2,78%
Seq. ID N ^o 124	Seq. ID N ^o 150	5,56%
Seq. ID N ^o 125	Seq. ID N ^o 151	5,56%
Seq. ID N ^o 126	Seq. ID N ^o 152	5,56%
Seq. ID N ^o 127	Seq. ID N ^o 153	2,78%
Seq. ID N ^o 128	Seq. ID N ^o 154	2,78%
Seq. ID N ^o 129	Seq. ID N ^o 155	8,33%
Seq. ID N ^o 130	Seq. ID N ^o 156	2,78%
Seq. ID N ^o 131	Seq. ID N ^o 157	2,78%
Seq. ID N ^o 132	Seq. ID N ^o 158	2,78%
Seq. ID N ^o 133	Seq. ID N ^o 159	2,78%
Seq. ID N ^o 134	Seq. ID N ^o 160	2,78%
Seq. ID N ^o 135	Seq. ID N ^o 161	2,78%
Seq. ID N ^o 136	Seq. ID N ^o 162	2,78%
Seq. ID N ^o 137	Seq. ID N ^o 163	5,56%
Seq. ID N ^o 138	Seq. ID N ^o 164	2,78%

Os clones selecionados na seleção acima descrita, quando alinhados entre si não mostraram definição clara de sequências consenso, como mostrado na TABELA 5 que apresenta o alinhamento entre os clones dos diferentes tipos de eluição frente anticorpos de pacientes com Leishmaniose Tegumentar, onde A: Eluição ácida e B: Eluição Específica. Em contrapartida, observou-se entre as seleções a presença de clones repetidos nos dois diferentes tipos de seleção (Seq. ID N^o 114 - Seq. ID N^o 140, Seq. ID N^o 118 - Seq. ID N^o Seq. ID N^o 144, Seq. ID N^o 119 - Seq. ID N^o 145, Seq. ID N^o 121 - Seq. ID N^o 147, Seq. ID N^o 122 - Seq. ID N^o 148, Seq. ID N^o 124 - Seq. ID N^o 150) por apresentarem alta e comum reatividade aos alvos utilizados nas seleções, além de mostrarem alinhamentos em diversas sequências hipotéticas de várias espécies de *Leishmania* merecem atenção particular como alvos a serem utilizados no diagnóstico e profilaxia da Leishmaniose Tegumentar.

TABELA 5

A	
SEQ-118/144	---SSALHAATQAPQ
SEQ-119/145	---SSALSAATTAHR
SEQ-115/141	---LRLIDEVPAELV
SEQ-124/150	---MRAIDSYPEPSV
SEQ-113/139	---DLIQTVMTRTAG
SEQ-117/143	---DQTLFSMTRTPP
SEQ-122/148	QTANNVIASMTR---
SEQ-123/149	Q--NKVIDAMSRHP-
SEQ-121/147	QP-DMNILAMSR-P-
SEQ-116/142	--IPSTTEPIILGL-
SEQ-120/146	---KIESSWLLSDKR
SEQ-114/140	---SSPYSMRLAKLE
B	
SEQ-133/159	-LKQDLVISY-MAR----
SEQ-137/163	-SPFDQVLSS-MTR----
SEQ-136/162	----DPVILS-ITRLLK-
SEQ-134/160	----D-LITMSMSRS-PR
SEQ-138/164	----DPLITM-MTRTFP-
SEQ-125/151	-TPSGAQLWD-ILH----
SEQ-127/153	-TPSGAQLWN-NLH----
SEQ-126/152	MAPDGAQWE-AR-----
SEQ-128/154	--TMKTELYN-LQLL---

SEQ-132/158	----QTLLIN-IQGATK-
SEQ-129/155	---YSMKTQGWSAL---
SEQ-130/156	---YKLDSSHLLRGK---
SEQ-131/157	---MRAIDEHGIRPP---
SEQ-135/161	---QRMIDSVPVPSA---

Exemplo 2:

Este exemplo refere-se à confirmação da reatividade dos peptídeos selecionados a partir das Eluições Específicas para Leishmaniose Visceral objetos desta invenção.

5 Foram analisados por meio de "dot-blot" os clones obtidos a partir das Seleções Específicas Tipo 2 e 3 mencionadas anteriormente identificados pelas seqüências Seq. ID Nº 25 a Seq. ID Nº 56 e suas correspondentes invertidas Seq. ID Nº 81 a Seq. ID Nº 112.

10 Todos os clones representantes de cada uma das seqüências foram testados contra soros de pacientes com Leishmaniose Visceral (V), Leishmaniose Tegumentar (T) e Controles Negativos (N). Nenhuma resposta cruzada foi verificada, mostrando que os clones foram positivamente selecionados pelo alvo específico como pode ser visto na FIGURA 1.

15 Dentre os clones selecionados contra o antígeno recombinante rK39 apresentaram positividade os identificados pelas seguintes seqüências e suas correspondentes invertidas: Seq. ID Nº 25 (Seq. ID Nº 81), Seq. ID Nº 26 (Seq. ID Nº 82), Seq. ID Nº 31 (Seq. ID Nº 87), Seq. ID Nº 32 (Seq. ID Nº 88), Seq. ID Nº 34 (Seq. ID Nº 90), Seq. ID Nº 37 (Seq. ID Nº 93), Seq. ID Nº 41 (Seq. ID Nº 97) e Seq. ID Nº 42 (Seq. ID Nº 98).

20 Para os clones selecionados contra antígeno total de *Leishmania chagasi* as seguintes seqüências e suas correspondentes invertidas apresentaram positividade: Seq. ID Nº 43 (Seq. ID Nº 99), Seq. ID Nº 44 (Seq. ID Nº 60), Seq. ID Nº 50 (Seq. ID Nº 106), Seq. ID Nº 52 (Seq. ID Nº 108), Seq. ID Nº 53 (Seq. ID Nº 109) e Seq. ID Nº 54 (Seq. ID Nº 110). A TABELA 6
25 mostra a positividade dos clones neste ensaio relacionado à presença de região consenso na molécula (indicados por sinal +), o que evidencia que há

relação da presença consenso com a reatividade diferencial dos peptídeos recombinantes.

TABELA 6

Peptídeos	Peptídeos invertidos Correspondentes	Frequência (%)	Dot – Blot	Seq Cons
Seleção Tipo 2 – Eluição Específica – rK39 - 30 clones				
Seq. ID N ^o 25	Seq. ID N ^o 81	16,67	+	
Seq. ID N ^o 26	Seq. ID N ^o 82	3,33	+	+
Seq. ID N ^o 27	Seq. ID N ^o 83	3,33		
Seq. ID N ^o 28	Seq. ID N ^o 84	6,67		
Seq. ID N ^o 29	Seq. ID N ^o 85	3,33		
Seq. ID N ^o 30	Seq. ID N ^o 86	3,33		
Seq. ID N ^o 31	Seq. ID N ^o 87	10,0	+	+
Seq. ID N ^o 32	Seq. ID N ^o 88	3,33	+	+
Seq. ID N ^o 33	Seq. ID N ^o 89	3,33		
Seq. ID N ^o 34	Seq. ID N ^o 90	20,0	+	+
Seq. ID N ^o 35	Seq. ID N ^o 91	3,33		
Seq. ID N ^o 36	Seq. ID N ^o 92	3,33		
Seq. ID N ^o 37	Seq. ID N ^o 93	3,33	+	+
Seq. ID N ^o 38	Seq. ID N ^o 94	3,33		
Seq. ID N ^o 39	Seq. ID N ^o 95	3,33		
Seq. ID N ^o 40	Seq. ID N ^o 96	3,33		
Seq. ID N ^o 41	Seq. ID N ^o 97	3,33	+	+
Seq. ID N ^o 42	Seq. ID N ^o 98	3,33	+	+
Seleção Tipo 3 - Eluição Específica – 29 clones				
Seq. ID N ^o 43	Seq. ID N ^o 99	31,03	+	+
Seq. ID N ^o 4	Seq. ID N ^o 60	6,9	+	+
Seq. ID N ^o 44	Seq. ID N ^o 100	3,45		
Seq. ID N ^o 45	Seq. ID N ^o 101	3,45		
Seq. ID N ^o 46	Seq. ID N ^o 102	3,45		
Seq. ID N ^o 47	Seq. ID N ^o 103	3,45		
Seq. ID N ^o 48	Seq. ID N ^o 104	3,45		
Seq. ID N ^o 49	Seq. ID N ^o 105	3,45		
Seq. ID N ^o 50	Seq. ID N ^o 106	3,45	+	+
Seq. ID N ^o 51	Seq. ID N ^o 107	3,45		
Seq. ID N ^o 52	Seq. ID N ^o 108	20,69	+	
Seq. ID N ^o 53	Seq. ID N ^o 109	3,45	+	
Seq. ID N ^o 54	Seq. ID N ^o 110	3,45	+	+
Seq. ID N ^o 55	Seq. ID N ^o 111	3,45		
Seq. ID N ^o 56	Seq. ID N ^o 112	3,45		

Os clones positivos no ensaio de “dot blot” acima relacionados foram submetidos a um ensaio de “dot-blot” competitivo, no qual os anticorpos do tipo IgG de pacientes com a doença em questão foram incubados com antígeno total de *Leishmania chagasi* com as seguintes concentrações: 1- controle sem antígeno, 2 - 0,5 µg/mL, 3 - 1,3 µg/mL, 4 - 4,9 µg/mL, 5 - 14,8 µg/mL, 6 - 44,4 µg/mL, 7 - 133,3 µg/mL e 8 - 400 µg/mL, como mostrado na FIGURA 2. A reação prévia dos anticorpos com o antígeno total, antes de reagirem com os peptídeos recombinantes expressos na superfície de fagos, teve o intuito de bloquear sítios ligantes comuns entre estes diferentes antígenos.

Dentre os clones selecionados contra o antígeno recombinante rK39, tiveram reatividade inibida frente ao antígeno de *Leishmania*, os identificados pelas sequências abaixo citadas e suas respectivas sequências invertidas: Seq. ID N^o 31 (Seq. ID N^o 87), Seq. ID N^o 32 (Seq. ID N^o 88), Seq. ID N^o 34 (Seq. ID N^o 90) e Seq. ID N^o 42 (Seq. ID N^o 98).

Para os clones selecionados contra antígeno total de *Leishmania chagasi*, tiveram reatividade inibida frente ao antígeno de *Leishmania*, as seguintes sequências e suas sequências invertidas correspondentes: Seq. ID N^o 43 (Seq. ID N^o 99), Seq. ID N^o 4 (Seq. ID N^o 60), Seq. ID N^o 50 (Seq. ID N^o 106) e Seq. ID N^o 54 (Seq. ID N^o 110).

A descrição detalhada dos procedimentos experimentais adotados poderá levar a melhor compreensão dos exemplos acima citados.

A purificação de imunoglobulinas foi realizada por imunocromatografia a partir de um “pool” destes soros, utilizando coluna de proteína A sepharose. A coluna foi equilibrada com 10 volumes de tampão fosfato (0,1 M, pH 8,0). As amostras de soro diluídas em tampão fosfato (vol/vol) foram acrescentadas à resina e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, a coluna foi lavada com tampão fosfato, sendo a absorbância a 280 nm monitorada em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro – Amersham Biosciences) até igualar-se a zero. Cada amostra foi eluída com tampão glicina (0,1 M pH 2,7), sendo coletada frações de 1 mL que foram também monitoradas por leitura espectrofotométrica. As frações com maiores leituras

foram agrupadas e o pH neutralizado com NaOH 0,1 M. Assim, foram transferidas para membrana de diálise, concentradas em açúcar comercial (1h, 4°C) e em seguida dialisadas em 3L de tampão fosfato durante toda a noite em câmara fria a 4°C. A quantificação deu-se por leitura direta em espectrofotômetro a 280 nm.

Para a seleção dos peptídeos recombinantes (peptídeos recombinantes expressos na proteína pIII de fagos filamentosos) foi utilizada uma biblioteca comercial de 12 aminoácidos (Ph.D. – 12TM mer - *New England Biolabs*). Os procedimentos experimentais foram baseados no protocolo disponibilizado pelo fabricante, com adequações para a melhor seleção de clones específicos.

Para os experimentos designados do tipo Eluição Ácida, tanto para os de Leishmaniose Visceral como para os de Leishmaniose Tegumentar, os procedimentos para a seleção de peptídeos recombinantes foram realizados em fase aquosa.

Como substrato para a realização deste processo, foram utilizados 50 µL de proteína G agarose em 50% de solução aquosa (recombinat Protein G Agarose – InvitrogenTM), que foram lavados por ressuspensão em microtubo com 1mL de TBS-T (Tris-HCl 50 mM – pH 7.5, NaCl 150 mM – Tween 20 0,1%), o sobrenadante foi retirado cuidadosamente após centrifugação à 4.000 rpm por 30 segundos em centrífuga refrigerada. Em seguida, a resina foi bloqueada por uma hora com tampão de bloqueio (NaHCO₃ 0,1M, pH 8,6; BSA 5mg/mL; NaN₃ 0,02%) a 4°C, sendo misturada de 15 em 15 minutos. Após a incubação, a mesma foi lavada por quatro vezes, conforme descrito anteriormente, para então receber a mistura de 300 ng de anticorpo purificado, juntamente com $1,5 \times 10^{11}$ partículas virais em um volume final de 200 µL de TBS-T 0,1%, previamente incubados à temperatura ambiente por 20 minutos.

A mistura resina – anticorpo – fago foi invertida suavemente por três vezes durante os 15 minutos de incubação a temperatura ambiente e em seguida lavada por mais 10 vezes com um mL de TBS-T 0,1%, preparando-a para a eluição dos fagos ligantes feita com um mL de tampão de eluição

(Glicina-HCl 0,2 M, pH 2,2; 1mg/mL de BSA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Esta mistura foi centrifugada por 1 minuto a 4.000 rpm, o eluato foi transferido para um novo tubo e imediatamente neutralizado com 150 µL de Tris-HCl (1 M, pH 9,1).

5 Uma pequena amostra deste eluato (10 µL) foi titulada e o restante foi utilizado para reamplificação, realizada em 20 mL de cultura de *E. coli* (ER 2738) em fase inicial de crescimento ($OD_{600} \leq 0,3$) contendo tetraciclina e incubada por 4,5 horas em agitador com temperatura controlada a 37°C, antes do procedimento de precipitação dos fagos e posterior titulação.

10 Os fagos reamplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo ($2,0 \times 10^{11}$ ufc) e assim subseqüentemente por um total de quatro ciclos, sendo que a partir do segundo ciclo a estringência do tampão de lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5%, utilizando-se então, 0,5% de Tween-20 em todas as lavagens. Após o término das seleções os fagos contendo os peptídeos recombinantes foram isolados e sequenciados (os
15 procedimentos serão descritos posteriormente).

Para os experimentos descritos como Eluições Específicas com antígenos de parasitas, tanto para Leishmaniose Visceral como para Leishmaniose Tegumentar os procedimentos foram realizados em fase sólida.

20 No primeiro ciclo de seleção, um poço de uma placa de microtitulação (Corning Incorporated Costar®) foi sensibilizado com 150µL de anticorpos do tipo IgG de um "pool" de soros de pacientes com Leishmaniose Visceral (purificados por imunocromatografia, concentrados, dialisados e quantificados por leitura espectrofotométrica direta), numa concentração de 100 µg/mL em
25 tampão carbonato ($NaHCO_3$ 0,1 M, pH 8,6). A incubação ocorreu por toda a noite à temperatura de 4°C, sob agitação em ambiente umidificado.

Após o descarte da solução e secagem da placa, esta foi bloqueada com 300 µL de solução de bloqueio ($NaHCO_3$ 0.1 M, pH 8,6, 5 mg/mL BSA) por 1 hora a 4°C. A solução foi descartada e a placa lavada por 6 vezes com TBST
30 (TBS - Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, água, 0,1% volume/volume de Tween 20) para então acrescentar 4×10^{10} partículas virais (10 µL da biblioteca

comercial original) diluídas em 100 µL de TBST, sendo a placa mantida sob agitação por uma hora em temperatura ambiente. Os fagos não ligantes aos anticorpos foram retirados e a placa lavada por 10 vezes com TBST para a adição de 100 µL de uma solução 100 µg/mL de anticorpos do tipo IgG de pacientes controle saudáveis purificados para a eluição dos fagos ligantes a esses tipos de anticorpos, chamada então de eluição negativa. Esta mistura foi incubada por uma hora em temperatura ambiente, sob agitação. Os fagos contidos no sobrenadante foram descartados e a placa lavada por mais 10 vezes com TBST. Uma segunda eluição foi realizada, utilizando o antígeno recombinante rK39 na concentração de 100 µg/mL em um volume de 100 µL, com incubação de uma hora a temperatura ambiente. Os fagos contidos no sobrenadante, ligantes ao rK39, foram coletados para posterior amplificação e a placa foi novamente lavada por mais 10 vezes para realização da terceira eluição com 100 µL de uma solução (100 µg/mL) de antígeno total de *L. chagasi*, a incubação foi de uma hora a temperatura ambiente, e os fagos em sobrenadante foram também coletados para posterior amplificação. Os fagos provenientes das eluições com os antígenos foram utilizados nos ciclos posteriores da seleção. Uma pequena alíquota (1 µL) de ambos eluatos foram titulados para mensurar o número de partículas virais por titulação e o restante foi amplificado para serem utilizados nos ciclos posteriores.

A partir do segundo ciclo de seleção, dois poços foram sensibilizados com anticorpos purificados de pacientes positivos para Leishmaniose como anteriormente descrito. Para cada um destes poços foi feita a eluição negativa e específica, um para rK39 (Seleção Específica do Tipo 2) e outro para antígeno total de *L. chagasi* (Seleção Específica Tipo 3). Todos os procedimentos de bloqueio e lavagem foram semelhantes ao descrito anteriormente, exceto a concentração do tampão de lavagem que passou a ser TBST que passou a 0,5% (TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, água, 0,5% volume/volume de Tween 20) no segundo e demais ciclos.

Desta forma foram realizados um total de quatro ciclos, e então o eluato não amplificado foi titulado e as colônias azuis, foram colocadas

individualmente em poços de placas "Deep Well" com 1,2 mL meio de cultura LB (20 µg/mL de tetraciclina) contendo bactérias ER2738 em fase inicial de crescimento. A cultura foi incubada sob agitação vigorosa (250 rpm/min) durante 5 horas. Após este período foram feitas alíquotas para "back-up" e as
5 placas com a cultura restante permaneceram em incubação durante toda a noite para extração de DNA individual dos clones.

Para todos os processos de reamplificação e precipitação dos fagos recombinantes o procedimento foi o seguinte: A cultura foi transferida para um tubo de centrifuga e centrifugada (10 min, 4.000 rpm). As células residuais
10 foram descartadas e o sobrenadante transferido para um novo tubo e re-centrifugado. Foi pipetado 80% do sobrenadante superior para um tubo limpo, onde foi adicionado 20% do volume de PEG-NaCl (20% peso/volume de polietileno glicol-8000; NaCl 2,5 M) e a mistura permaneceu em repouso durante toda a noite a 4°C. No dia seguinte, o produto da precipitação foi
15 centrifugado por 15 min a 10.000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi novamente centrifugado, nas mesmas condições anteriores por mais 5 minutos para que o sobrenadante residual pudesse ser removido. O "pellet" de fagos foi ressuspendido em 1 mL de TBS 1X, que foi transferido para um microtubo e centrifugado (5 min, 10.000 rpm, 5 min) para retirada das células
20 residuais. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, para a adição de PEG-NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada por 1 hora em gelo e então centrifugada (15 min, 14.000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o tubo re-centrifugado por mais 5 minutos para retirada do sobrenadante residual. O "pellet" foi ressuspendido em 200 µL de TBS 1X, estando prontos
25 para a titulação.

O procedimento de titulação foi o seguinte tanto para os eluatos amplificados como para os não amplificados: foram realizadas diluições seriais de 10^{-1} a 10^{-4} e de 10^{-8} a 10^{-11} , respectivamente. A nove µL de cada diluição foram adicionados 200 µL de bactérias ER2738 ($OD_{600} > 0,5$) incubando a
30 mistura por 5 minutos antes que fosse plaqueada em meio LB (Tetraciclina: 20 µg/mL, IPTG: 0,5 mM e X-gal 40 µg/mL), juntamente com 3 mL de Agarose Top

(10 g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1 g de MgCl₂ · 6H₂O / litro). As placas foram incubadas a 37°C por toda noite, e as colônias azuis representantes das colônias infectadas por fagos foram contadas para obtenção do número de partículas infectantes (pfus) para entrada nos ciclos
5 posteriores.

Para a extração de DNA dos fagos recombinantes, as colônias provenientes dos ciclos de seleção foram isoladas em placas "deep well" contendo 1 mL de meio de cultura com Bactérias ER2738 (OD₆₀₀ > 0,3) e incubadas sob agitação a 37°C por 24 horas. Após o período de cultura as
10 placas foram centrifugadas por 10 minutos a 3.700 rpm a 4°C, e 800 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa, onde foi acrescentado 350 µL de PEG-NaCl e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada por 40 minutos a 3.700 rpm, a 20°C. O sobrenadante foi descartado e a placa foi invertida sobre papel absorvente para retirar o
15 excesso de meio de cultura. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de tampão iodeto (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaI 4 M) e foi adicionado 250 µL de Etanol Absoluto, incubando a mistura por mais 10 minutos a temperatura ambiente antes de submetê-la novamente a centrifugação por 40 minutos a
20 20°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 150 µL de Etanol 70%, e centrifugado por mais 15 minutos a 20°C. Todas as centrifugações ocorreram com rotação de 3.700 rpm. O DNA foi solubilizado em 20 µL de água ultrapura estéril e qualificado por eletroforese em gel de Agarose 0,8%, comparando-o com padrão de DNA de fago M13 disponibilizado pelo fabricante da biblioteca.

25 As amostras isoladas foram submetidas a sequenciamento automático utilizando o Kit *Big Dye Terminator* (GE Healthcare) e sequenciador automático *MegaBace 1000* (GE Healthcare). Na reação de sequenciamento, utilizou-se aproximadamente 3 µL de DNA (dependendo da quantificação média dada por leitura espectrofotométrica), 4µL de *premix* e 10 pmoles do *primer* – 96 M13 –
30 (5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG -3'- GE Healthcare), que amplifica a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados nos

fagos M13 recombinantes, sendo o volume da reação completado para 10 µL. A reação ocorreu em termociclador (Mastercycler, Eppendorf) por 35 ciclos, com desnaturação de 30 segundos a 95°C, anelamento dos primers por 30 segundos a 50°C e extensão por 30 segundos a 60°C.

5 O processamento das sequências foi feito pelo “software” do equipamento (Sequence Analyser, BASE CALLER, Cimarron 3.12, Phred 15). Com posse das sequências de DNA, estas foram traduzidas pelo programa DNA2PRO (<http://relic.bio.anl.gov/programs.aspx>), gerando as sequências de 12 peptídeos esperadas.

10 Os alinhamentos entre as sequências distintas foram feitos pelo programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) para delinear prováveis consensos. Os alinhamentos das sequências com proteínas de *Leishmania* foram realizados pelo programa BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

15 Os fagos mais freqüentes nas populações das seleções específicas (Seleção Tipo 2 e Seleção Tipo 3) para Leishmaniose Visceral e os controles (fago selvagem e antígeno recombinante rK39) foram submetidos a ensaios de dot-blot competitivo com antígeno total de *L. chagasi* e fago selvagem.

20 Os 33 clones com sequências distintas foram testados em ensaio de dot-blot contra anticorpos purificados de pacientes com Leishmaniose Visceral, Tegumentar e Controle saudável, juntamente com os seguintes controles: Fago selvagem, Fago irrelevante (selecionado a partir de outra seleção) e antígeno recombinante rK39.

25 As membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com fagos (5,0x 10⁹ partículas virais diluídas em dois µL de TBS), deixando que secassem por 2 minutos a temperatura ambiente. Cada membrana foi bloqueada com um mL de solução de bloqueio (TBS-M Mólico 5%), incubada sob agitação por duas horas e posteriormente lavada por três vezes com tampão de lavagem (TBST - 0,5% de Tween 20). Foram adicionados a cada membrana, 500 µL do
30 respectivo anticorpo purificado (Visceral, Tegumentar, Negativo) na concentração de 25 µg/mL diluído em bloqueio, e em seguida, incubou-se por

uma hora. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas por seis vezes com tampão de lavagem e incubadas com 500 µL de anticorpo secundário anti-IgG marcado com Fosfatase Alcalina diluído em bloqueio e incubadas por uma hora e em seguida, lavadas por mais 6 vezes, reveladas com solução de NBT/BCIP e lavadas com água antes de serem secas para a digitalização das imagens. Todas as incubações foram realizadas a temperatura ambiente e sob agitação lenta.

Os clones com maior reatividade no ensaio anterior foram submetidos a um novo ensaio competitivo (14 clones) juntamente com os controles (Fago Selvagem, Fago Irrelevante, Antígeno total de *L.chagasi* e antígeno recombinante rK39).

Os antígenos (fagos e controles) foram adicionados sobre as tiras de membrana de nitrocelulose, deixando em repouso para secagem por dois minutos e em seguida foi acrescentado um mL de bloqueio (TBS-M – Molico 5%) que agiu por duas horas. Durante este período, a solução de anticorpo purificado de pacientes com Leishmaniose Visceral foi incubada com antígeno total de *L. chagasi* diluído serialmente (de 400 µg/mL a 0,5 µg/mL incluindo controle sem anticorpo). Após o período de bloqueio, as membranas foram lavadas por três vezes com tampão de lavagem (TBS-T – 0,5% de Tween 20) e foi então adicionada a mistura pré-incubada de anticorpos e antígenos, que permaneceram em contato com a membrana por uma hora. As membranas foram lavadas por mais seis vezes com o tampão de lavagem e adicionou-se 500 µL de anticorpo secundário anti- IgG marcado com Fosfatase Alcalina (1:5000 em bloqueio) e incubou-se por uma hora. Foram feitas seis lavagens como as acima descritas e posteriormente, procedeu-se a revelação com um mL de solução reveladora (NBT/BCIP). As membranas foram lavadas com água e secadas para digitalização das imagens. Todas as incubações citadas ocorreram à temperatura ambiente, sob agitação lenta.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS BIOLÓGICAS

(1) Informações gerais do Pedido de Patente

(i) Dados do Requerente:

a) **Nome:** Universidade Federal de Uberlândia

5 b) **Endereço:** Av. João Naves de Ávila, 2121 – Bloco 5L, Bairro Santa Mônica, CEP: 38400-902 - Uberlândia, MG.

(ii) **Título da invenção:** “PEPTÍDEOS RECOMBINANTES E MOTIVOS PROTÉICOS MIMÉTICOS A ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA* E SUAS APLICAÇÕES”

10 (iii) **Número de seqüências constantes do pedido:** 170 (cento e setenta)

(iv) **Formato para leitura no computador:** Microsoft Word; Windows XP; computador tipo PC.

(2) Informações gerais das seqüências

Características das moléculas seqüenciadas:

15 a) **Tipo:** PROTEÍNA

b) **Nome da Proteína:** Proteínas recombinantes miméticas a proteínas de *Leishmania*

c) **Identidade das Seqüências:** Seq. ID Nº 1 a Seq ID Nº 170.

d) **Fonte original das moléculas:** GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/)

20 3- Informações para Seq. ID Nº 1

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

25 Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 1:

Ala Phe Thr Asp Lys Ala Ser Ala Arg Pro Lys Ala
1 5 10

3- Informações para Seq. ID Nº 2

Características da seqüência:

30 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 2:

Ala Thr Glu Ala His Pro Thr Thr Leu Ala Arg Lys
 5 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 3

Características da seqüência:

a) Tamanho: 12 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

10 **c) Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 3:

Ala Thr Leu Arg Asn Trp Ile Pro Pro Ser Ser Thr
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 4

15 **a) Características da seqüência:**

a) Tamanho: 12 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 4:

20 Ala Thr Pro Asp Arg Ser Arg Ile Glu Ser Arg Leu
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 5

Características da seqüência:

a) Tamanho: 12 aminoácidos

25 **b) Tipo:** aminoácido

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 5:

Ala Thr Pro Arg Ser His Met Leu Ala Ser Ser Ser
 1 5 10 12

30 **3- Informações para Seq. ID Nº 6**

Características da seqüência:

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

5 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 6:**

Ala Thr Pro Arg Ser Leu Ser Thr Val Ile Ser Ile
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 7**Características da seqüência:**

- 10 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 7:

15 Ala Thr Pro Arg Ser Met His Pro Leu Pro Asp Leu
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 8**Características da seqüência:**

- 20 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 8:

Ala Thr Pro Arg Ser Met Ile Ala Pro Pro Thr Ala
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 925 **Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 9:

30 Ala Thr Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gln Ser Gln Ile
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 10**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

5

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 10:

Ala	Thr	Pro	Arg	Ser	Val	His	Ser	Thr	Ala	Gln	Pro
1			5						10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 11**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

10

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 11:

Phe	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Ala	Gln	Ser	Ser	Leu	Ser
1			5						10		12

15

3- Informações para Seq. ID Nº 12**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

20

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 12:

Gly	Leu	His	Lys	Leu	Ala	Gly	Leu	Asn	Leu	Arg	Ser
1			5						10		12

25

3- Informações para Seq. ID Nº 13**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

30

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 13:

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 17:

Ser Val Ser Val Gly Met Lys Pro Ser Pro Arg Pro
1 5 10 12

5 **3- Informações para Seq. ID Nº 18**

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

10 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 18:**

Thr Pro Ser Ser Ala Ser Ser Val Ala Thr Leu Arg
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 19

Características da seqüência:

15 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 19:

20 Thr Ser Ala Ala Thr Met Arg Leu Leu Lys Ser Asp
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 20

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

25 c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 20:

Thr Thr Pro Arg Ser Glu Ile Pro Tyr Pro Ile Ile
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 21

30 **Características da seqüência:**

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 21:

5 Val Cys Phe Cys Gly Tyr Glu Thr Glu Ser Gln Glu
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 22

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

10 b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 22:

Val Gln Ser Ala Thr Leu Arg Asn Trp Ile Ala Ser
1 5 10 12

15 3- Informações para Seq. ID Nº 23

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 23:

20 Tyr Ala Ala Thr Pro Arg Ser His Leu Thr Glu Leu
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 24

Características da seqüência:

25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 24:

30 Tyr Ala Ala Thr Pro Arg Ser His Leu Thr Gly Pro
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 25**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 25:**

Leu	Thr	Gln	Lys	Phe	Ser	Gly	Ile	Asp	Ile	Lys	Arg
1			5						10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 26**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 26:**

Glu	Lys	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Leu	His	Gly	Val	Pro
1			5						10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 27**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 27:**

Val	Val	Thr	Arg	Tyr	Asn	Asp	Asn	Ile	Arg	His	Ser
1			5						10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 28**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 28:**

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 32:

Val	Thr	Pro	Arg	Ser	Leu	Asn	Val	Asp	Pro	Ser	Arg
1				5					10		12

5 **3- Informações para Seq. ID Nº 33**

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

10 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 33:**

Ile	Thr	Pro	Arg	Ser	Asn	Gln	Ala	Thr	Tyr	Leu	Leu
1				5					10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 34

Características da seqüência:

15 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 34:

Ala	Thr	Pro	Gln	Arg	Asn	Ser	Ile	Leu	Val	Gln	Ser
1				5					10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 35

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

25 c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 35:

Tyr	Ala	Ser	Ala	Asn	Thr	Ser	Arg	Thr	Ile	Tyr	Thr
1				5					10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 36

30 **Características da seqüência:**

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 36:

5 His His Phe Thr His Ile Ser Leu Pro Leu Val Arg
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 37

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

10 b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 37:

Ala Thr Gln Arg Asn Ala Tyr Pro Ser Gly Pro His
1 5 10 12

15 3- Informações para Seq. ID Nº 38

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

20 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 38:**

Ile Asn His Ser Thr Ala Glu Ser Arg Tyr Phe Met
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 39

Características da seqüência:

25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 39:

30 Ser Phe His Leu Pro Arg Glu Trp His Ala Ser Pro
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 40**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 40:**

Met	Asn	Ala	Gly	Ser	Asn	Ala	Phe	Ser	Cys	Leu	Thr
1				5					10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 41**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 41:**

Ile	Asn	Pro	Ser	Tyr	His	Pro	Phe	Arg	Met	Pro	Ala
1				5					10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 42**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**b. Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 42:**

Ala	Ser	Pro	Arg	Ser	Ser	Phe	Leu	Leu	Glu	Lys	Ala
1				5					10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 43**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 43:**

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 51:

5 Thr Pro Phe Met Lys Thr Val Leu Leu Thr Ser Ala
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 52

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

10 b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 52:

Tyr Pro Thr Lys Ala Ser Gly Asn Asp Leu Arg Gly
1 5 10 12

15 3- Informações para Seq. ID Nº 53

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

20 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 53:**

Tyr Asp Leu Asn Val His Tyr Leu Pro Pro Lys Pro
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 54

Características da seqüência:

25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 54:

30 Ala Thr Pro Arg Ser Ile His Gly Phe Trp Arg Arg
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 55**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 55:

Gly Lys Ala Pro Thr Ile Thr Ala Leu Pro Gln Ala
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 56**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 56:

Gly Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gln Val Pro Leu His
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 57**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 57:

Ala Lys Pro Arg Ala Ser Ala Lys Asp Thr Phe Ala
 1 5 7 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 58**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 58:

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 62:

Ile Ser Ile Val Thr Ser Leu Ser Arg Pro Thr Ala
1 5 10 12

5 **3- Informações para Seq. ID Nº 63**

Características da seqüência:

a) Tamanho: 12 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

10 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 63:**

Leu Asp Pro Leu Pro His Met Ser Arg Pro Thr Ala
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 64

Características da seqüência:

15 **a) Tamanho: 12 aminoácidos**

b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 64:

20 Ala Thr Pro Pro Ala Ile Met Ser Arg Pro Thr Ala
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 65

Características da seqüência:

a) Tamanho: 12 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

25 **c) Topologia: linear**

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 65:

Ile Gln Ser Gln Pro Leu Ser Ser Arg Pro Thr Ala
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 66

30 **Características da seqüência:**

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 66:

5 Pro Gln Ala Thr Ser His Val Ser Arg Pro Thr Ala
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 67

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

10 b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 67:

Ser Leu Ser Ser Gln Ala Asp Glu Lys Leu Ala Phe
1 5 10 12

15 3- Informações para Seq. ID N° 68

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

20 **Descrição da seqüência: Seq. ID N° 68:**

Ser Arg Leu Asn Leu Gly Ala Leu Lys His Leu Gly
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 69

Características da seqüência:

25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 69:

30 Leu His Asp Arg Leu Asn Leu Gly Ala Leu Lys His
1 5 10 12

b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 77:

5 Glu Gln Ser Glu Thr Glu Tyr Gly Cys Phe Cys Val
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 78

Características da seqüência:

a) Tamanho: 12 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

10 **c) Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 78:

 Ser Ala Ile Trp Asn Arg Leu Thr Ala Ser Gln Val
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 79

15 **Características da seqüência:**

a) Tamanho: 12 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 79:

20 Leu Glu Thr Leu His Ser Arg Pro Thr Ala Ala Tyr
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 80

Características da seqüência:

a) Tamanho: 12 aminoácidos

25 **b) Tipo:** aminoácido

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 80:

 Pro Gly Thr Leu His Ser Arg Pro Thr Ala Ala Tyr
 1 5 10 12

30 **3- Informações para Seq. ID Nº 81**

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 81:

5 Arg Lys Ile Asp Ile Gly Ser Phe Lys Gln Thr Leu
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 82

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

10 b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 82:

Pro Val Gly His Leu Ser Thr Gly Ser Ser Lys Glu
1 5 10 12

15 3- Informações para Seq. ID Nº 83

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

20 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 83:**

Ser His Arg Ile Asn Asp Asn Tyr Arg Thr Val Val
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 84

Características da seqüência:

25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 84:

30 Arg Tyr Gly Ala Phe Leu Met Pro Ala Thr Gly Ile
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 85**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID N° 85:**

His	Ile	Leu	Pro	Leu	Ser	Arg	Thr	Leu	Thr	Thr	Thr
1			5					10			12

3- Informações para Seq. ID N° 86**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID N° 86:**

Thr	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Trp	Arg	Thr	Asp	Leu	Asn
1			5					10			12

3- Informações para Seq. ID N° 87**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID N° 87:**

Pro	Ala	Ala	Tyr	Gln	Ile	Gln	Ser	Arg	Pro	Thr	Gly
1			5						10		12

3- Informações para Seq. ID N° 88**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID N° 88:**

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 96:

5 Thr Leu Cys Ser Phe Ala Asn Ser Gly Ala Asn Met
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 97

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

10 b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 97:

Ala Pro Met Arg Phe Pro His Tyr Ser Pro Asn Ile
1 2 10 12

15 3- Informações para Seq. ID N° 98

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 98:

20 Ala Lys Glu Leu Leu Phe Ser Ser Arg Pro Ser Ala
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 99

Características da seqüência:

25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 99:

30 Leu Thr Glu Ser Asp His Ile Ser Arg Pro Thr Ala
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 100**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

5

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 100:

Val Phe Arg Asp Lys Glu Leu Ala His Pro Ser Leu
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 101**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

10

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 101:

Gln Leu Arg Val Asp Pro Asp Gln His Ser Met His
 1 5 10 12

15

3- Informações para Seq. ID Nº 102**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

20

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 102:

Thr Ile Arg Phe Ala Arg Met Thr Thr Trp Asp Ser
 1 5 10 12

25

3- Informações para Seq. ID Nº 103**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

30

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 103:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 111:

5 Ala Gln Pro Leu Ala Thr Ile Thr Pro Ala Lys Gly
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 112

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

10 b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 112:

His Leu Pro Val Gln Ala Asn Arg Ile Ala Thr Gly
1 5 10 12

15 3- Informações para Seq. ID Nº 113

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

20 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 113:**

Asp Leu Ile Gln Thr Val Met Thr Arg Thr Ala Gly
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 114

Características da seqüência:

25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 114:

30 Ser Ser Pro Tyr Ser Met Arg Leu Ala Lys Leu Glu
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 115**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

5

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 115:

Leu Arg Leu Ile Asp Glu Val Pro Ala Glu Leu Val
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 116**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

10

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 116:

Ile Pro Ser Thr Thr Glu Pro Ile Ile Leu Gly Leu
 1 5 10 12

15

3- Informações para Seq. ID Nº 117**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

20

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 117:

Asp Gln Thr Leu Phe Ser Met Thr Arg Thr Pro Pro
 1 5 10 12

25

3- Informações para Seq. ID Nº 118**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

30

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 118:

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 122:

Gln Thr Ala Asn Asn Val Ile Ala Ser Met Thr Arg
 1 5 10 12

5 **3- Informações para Seq. ID N° 123**

Características da seqüência:

a) Tamanho: 12 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

10 **Descrição da seqüência: Seq. ID N° 123:**

Gln Asn Lys Val Ile Asp Ala Met Ser Arg His Pro
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 124

Características da seqüência:

15 **a) Tamanho: 12 aminoácidos**

b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 124:

20 Met Arg Ala Ile Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Ser Val
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 125

Características da seqüência:

a) Tamanho: 12 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

25 **c) Topologia: linear**

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 125:

Thr Pro Ser Gly Ala Gln Leu Trp Asp Ile Leu His
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 126

30 **Características da seqüência:**

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 126:

5 Met Ala Pro Asp Gly Ala Gln Trp Trp Glu Ala Arg
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 127

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

10 b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 127:

Thr Pro Ser Gly Ala Gln Leu Trp Asn Asn Leu His
1 5 10 12

15 3- Informações para Seq. ID Nº 128

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

20 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 128:**

Thr Met Lys Thr Glu Leu Tyr Asn Leu Gln Leu Leu
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 129

Características da seqüência:

25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 129:

30 Tyr Ser Met Lys Thr Gln Gly Trp Leu Ser Ala Leu
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 130**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

5

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 130:

Tyr Lys Leu Asp Ser Ser His Leu Leu Arg Gly Lys
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 131**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

10

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 131:

Met Arg Ala Ile Asp Glu His Gly Ile Arg Pro Pro
 1 5 10 12

15

3- Informações para Seq. ID Nº 132**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

20

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 132:

Gln Thr Leu Leu Ile Asn Ile Gln Gly Ala Thr Lys
 1 5 10 12

25

3- Informações para Seq. ID Nº 133**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

30

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 133:

c) Topologia: linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 137:**

Ser Pro Phe Asp Gln Val Leu Ser Ser Met Thr Arg
 1 5 10 12

5 3- Informações para Seq. ID Nº 138**Características da seqüência:**

- a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

10 Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 138:

Asp Pro Leu Ile Thr Met Met Thr Arg Thr Phe Pro
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 139**Características da seqüência:**

- 15 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 139:

20 Gly Ala Thr Arg Thr Met Val Thr Gln Ile Leu Asp
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 140**Características da seqüência:**

- 25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos
- b) **Tipo:** aminoácido
- c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 140:

Glu Leu Lys Ala Leu Arg Met Ser Tyr Pro Ser Ser
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 141

- 30 **Características da seqüência:**

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 141:

5 Val Leu Glu Ala Pro Val Glu Asp Ile Leu Arg Leu
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 142

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

10 b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 142:

Leu Gly Leu Ile Ile Pro Glu Thr Thr Ser Pro Ile
1 5 10 12

15 3- Informações para Seq. ID Nº 143

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

20 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 143:**

Pro Pro Thr Arg Thr Met Ser Phe Leu Thr Gln Asp
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 144

Características da seqüência:

25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 144:

30 Ser Ser Ala Leu His Ala Ala Thr Gln Ala Pro Gln
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 145**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 145:**

Arg His Ala Thr Thr Ala Ala Ser Leu Ala Ser Ser
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 146**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 146:**

Arg Lys Asp Ser Leu Leu Trp Ser Ser Glu Ile Lys
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 147**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 147:**

Pro Arg Ser Met Ala Leu Ile Asn Met Asp Pro Gln
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 148**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 148:**

Arg Thr Met Ser Ala Ile Val Asn Asn Ala Thr Gln
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 149

Características da seqüência:

- 5
- a) Tamanho: 12 aminoácidos
 - b) Tipo: aminoácido
 - c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 149:

10 Pro His Arg Ser Met Ala Asp Ile Val Lys Asn Gln
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 150

Características da seqüência:

- 15
- a) Tamanho: 12 aminoácidos
 - b) Tipo: aminoácido
 - c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 150:

Val Ser Pro Glu Pro Tyr Ser Asp Ile Ala Arg Met
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 151

Características da seqüência:

- 20
- a) Tamanho: 12 aminoácidos
 - b) Tipo: aminoácido
 - c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 151:

25 His Leu Ile Asp Trp Leu Gln Ala Gly Ser Pro Thr
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 152

Características da seqüência:

- 30
- a) Tamanho: 12 aminoácidos
 - b) Tipo: aminoácido

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 156:

5 Lys Gly Arg Leu Leu His Ser Ser Asp Leu Lys Tyr
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 157

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

10 b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 157:

Pro Pro Arg Ile Gly His Glu Asp Ile Ala Arg Met
1 5 10 12

15 3- Informações para Seq. ID N° 158

Características da seqüência:

a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

20 **Descrição da seqüência: Seq. ID N° 158:**

Lys Thr Ala Gly Gln Ile Asn Ile Leu Leu Thr Gln
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N° 159

Características da seqüência:

25 a) **Tamanho:** 12 aminoácidos

b) **Tipo:** aminoácido

c) **Topologia:** linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N° 159:

30 Arg Ala Met Tyr Ser Ile Val Leu Asp Gln Lys Leu
1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID Nº 160**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 160:**

Arg	Pro	Ser	Arg	Ser	Met	Ser	Met	Thr	Ile	Leu	Asp
1				5					10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 161**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 161:**

Ala	Ser	Pro	Val	Pro	Val	Ser	Asp	Ile	Met	Arg	Gln
1				5					10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 162**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 162:**

Lys	Leu	Leu	Arg	Thr	Ile	Ser	Leu	Ile	Val	Pro	Asp
1				5					10		12

3- Informações para Seq. ID Nº 163**Características da seqüência:**a) **Tamanho:** 12 aminoácidosb) **Tipo:** aminoácidoc) **Topologia:** linear**Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 163:**

Arg Thr Met Ser Ser Leu Val Gln Asp Pro Phe Ser
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N^o 164

Características da seqüência:

- 5
- a) Tamanho: 12 aminoácidos
 - b) Tipo: aminoácido
 - c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N^o 164:

10 Pro Phe Thr Arg Thr Met Met Thr Ile Leu Pro Asp
 1 5 10 12

3- Informações para Seq. ID N^o 165

Características da seqüência:

- 15
- a) Tamanho: 9 aminoácidos
 - b) Tipo: aminoácido
 - c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N^o 165:

His Lys Leu Ala Gly Lys Asn Leu Arg
 1 5 9

3- Informações para Seq. ID N^o 166

Características da seqüência:

- 20
- a) Tamanho: 9 aminoácidos
 - b) Tipo: aminoácido
 - c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID N^o 166:

25 Arg Leu Asn Lys Gly Ala Leu Lys His
 1 5 9

3- Informações para Seq. ID N^o 167

Características da seqüência:

- 30
- a) Tamanho: 5 aminoácidos
 - b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 167:

Ala Thr Pro Arg Ser
1 5

5 **3- Informações para Seq. ID Nº 168**

Características da seqüência:

a) Tamanho: 5 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

10 **Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 168:**

Ser Arg Pro Thr Ala
1 5

3- Informações para Seq. ID Nº 169

Características da seqüência:

15 **a) Tamanho: 4 aminoácidos**

b) Tipo: aminoácido

c) Topologia: linear

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 169:

20 Ala Thr Leu Ala
1 4

3- Informações para Seq. ID Nº 170

Características da seqüência:

a) Tamanho: 4 aminoácidos

b) Tipo: aminoácido

25 **c) Topologia: linear**

Descrição da seqüência: Seq. ID Nº 170:

Ala Leu Thr Ala
1 4

REIVINDICAÇÕES

1 - PEPTÍDEOS RECOMBINANTES MIMÉTICOS A ANTÍGENOS DE LEISHMANIA SEUS MOTIVOS PROTEICOS E SEQUÊNCIAS REVERSAS, caracterizadas por compreender as sequências Seq ID N^o 1 a Seq ID N^o 170.

5 2 - MOTIVOS PROTEICOS DE ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA*, conforme a reivindicação 1, caracterizadas por compreender as seqüências Seq ID N^o 165 a Seq ID N^o 170.

3 - PEPTÍDEOS, SUAS SEQUÊNCIAS REVERSAS E MOTIVOS PROTEICOS de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizadas por serem usadas no diagnóstico das leishmanioses, como sondas para detecção "in vitro" da presença de anticorpos circulantes ou outras moléculas ligantes contra parasitos do gênero *Leishmania*.

4 - PEPTÍDEOS, SUAS SEQUÊNCIAS REVERSAS E MOTIVOS PROTEICOS sintéticos ou recombinantes de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizados pela detecção de anticorpos circulantes ou moléculas circulantes a serem detectados por ensaios imunológicos, como por exemplo testes imunoenzimáticos (tais como ELISA, "Western Blot", imunofluorescência, imunohistoquímica, EIA, e outros), testes por imunoaglutinação, sensores eletroquímicos, "Quantum dots", IFL (imunoensaio de fluxo lateral) ou outras formas de detecção relacionadas direta ou indiretamente em amostras de fluídos corporais, como saliva, urina e sangue.

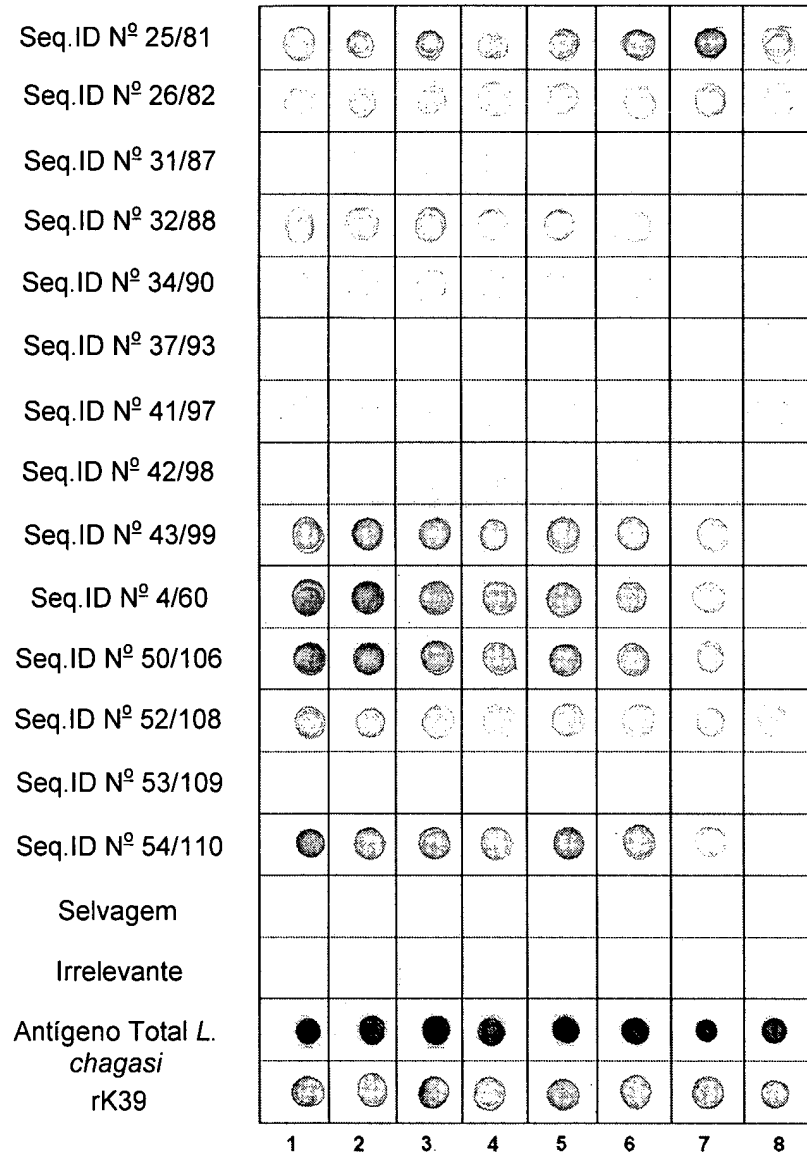
5 - PEPTÍDEOS, SUAS SEQUÊNCIAS REVERSAS E MOTIVOS PROTEICOS conforme a reivindicações 1 ou 2, caracterizados por serem utilizados na preparação de composições vacinais, para estimular o sistema imune humano ou animal contra parasitos do gênero *Leishmania*.

6 - PEPTÍDEOS, SUAS SEQUÊNCIAS REVERSAS E MOTIVOS PROTEICOS de acordo com as reivindicações 3 e 4, caracterizados pelo uso das sequências identificadas por Seq. ID N^o-1 a Seq. ID N^o 112 e Seq. ID N^o 165 a Seq. ID N^o 170 ser preferencialmente para diagnóstico diferencial da forma Visceral da leishmaniose e as Seq. ID N^o 113 a 164 preferencialmente para diagnóstico diferencial da forma Tegumentar da leishmaniose.

Figura 1

Seq.ID Nº 25/81							Seq.ID Nº 42/98
Seq.ID Nº 26/82							Seq.ID Nº 4/60
Seq.ID Nº 27/83							Seq.ID Nº 43/99
Seq.ID Nº 28/84							Seq.ID Nº 44/100
Seq.ID Nº 29/85							Seq.ID Nº 45/101
Seq.ID Nº 30/86							Seq.ID Nº 46/102
Seq.ID Nº 31/87							Seq.ID Nº 47/103
Seq.ID Nº 32/88							Seq.ID Nº 48/104
Seq.ID Nº 33/89							Seq.ID Nº 49/105
Seq.ID Nº 34/90							Seq.ID Nº 50/106
Seq.ID Nº 35/91							Seq.ID Nº 51/107
Seq.ID Nº 36/92							Seq.ID Nº 52/108
Seq.ID Nº 37/93							Seq.ID Nº 53/109
Seq.ID Nº 38/94							Seq.ID Nº 54/110
Seq.ID Nº 39/95							Seq.ID Nº 55/111
Seq.ID Nº 40/96							Seq.ID Nº 56/112
Seq.ID Nº 41/97							Selvagem
Selvagem							Irrelevante
Irrelevante							rK39
rK39				V	T	N	
	V	T	N				

Figura 2



RESUMO**“PEPTÍDEOS RECOMBINANTES E MOTIVOS PROTEICOS MIMÉTICOS A ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA* E SUAS APLICAÇÕES”**

A presente invenção refere-se à seleção, caracterização e utilização de
5 peptídeos recombinantes, suas sequências reversas e motivos proteicos que
mimetizam regiões antigênicas parciais de proteínas de *Leishmania* e
antígenos de interesse diagnóstico e vacinal para as doenças causadas por
parasitos do gênero *Leishmania*. Os peptídeos objetos desta invenção foram
selecionados por “Phage Display” e são alvos para utilização em
10 imunodiagnósticos e em composições vacinais para o controle dos diferentes
tipos de doença provocados pelos parasitos do gênero acima citado por serem
especificamente imunorreativos com o soro de indivíduos infectados.