



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015017724-0 A2

(22) Data do Depósito: 24/07/2015

(43) Data da Publicação: 21/11/2017



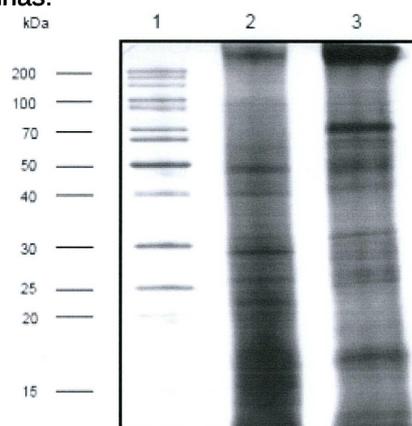
(54) **Título:** PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE LEISHMANIA SPP., PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E APLICAÇÕES

(51) **Int. Cl.:** C07K 7/08; G01N 33/569; A61K 39/008; A61P 33/02

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

(72) **Inventor(es):** VANETE THOMAZ SOCCOL;  
SILVANA MARIA ALBAN; JULIANA SEGER;  
EDUARDO SCOPEL FERREIRA DA COSTA

(57) **Resumo:** PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE Leishmania spp., PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E APLICAÇÕES A presente invenção trata da caracterização de peptídeos miméticos de Leishmania spp. utilizados para induzir resposta imunogênica e para testes de diagnóstico. A presente invenção compreende a identificação de mimotopos de antígenos de Leishmania spp.. Os peptídeos descritos na presente invenção apresentam utilidade em métodos, kits de diagnóstico e biosensores, bem como a composições imunológicas que os contenham como princípio ativo, tais como vacinas.



## **“PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E APLICAÇÕES”**

### **Campo da Invenção**

[001]. A presente invenção trata da obtenção de novos antígenos para uso em diagnóstico, prognóstico (método e *kit* de diagnóstico), vacinas (composições imunológicas) e em biosensores como medida de controle de leishmaniose a partir de peptídeos miméticos de *Leishmania spp.* utilizados isoladamente e/ou em associações.

### **Histórico da Invenção**

[002]. As leishmanioses estão entre as principais parasitoses negligenciadas, re-emergentes e afetam em torno de 350 milhões de indivíduos no mundo (Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines. OMS. 2012). A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e infecta humanos nas Américas, África, Ásia e Europa. Na América Latina a leishmaniose cutânea (LC) é conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e é causada por diferentes agentes etiológicos: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, L. (V.) *peruviana*, L. (V.) *panamensis*, L. (V.) *guyanensis*, L. (V.) *naiffii*, L. (V.) *lainsoni*, L. (V.) *shawi*, L. (*Leishmania*) *amazonensis* e L. (L.) *mexicana*. A leishmaniose visceral (LV) é causada por *Leishmania infantum* (sinonímia *L. chagasi*) que é mais severa podendo causar a morte na ausência de diagnóstico correto e tratamento precoce (LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983; THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. Annales de Parasitologie Humaine et Comparee, v. 68, n. 2, p. 107-108, 1993; THOMAZ-SOCCOL, V. et al. A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of Paraná State, southern

Brazil. Acta Tropica, v. 111, n. 3, p. 308-315. sep. 2009).

[003]. A forma clínica da doença se desenvolve após a inoculação do parasito no homem e está intimamente associada à resposta imune do hospedeiro, à espécie de *Leishmania* envolvida e a relação do parasita com seu hospedeiro (SARAVIA, N. G. et al. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 34, n. 4, p. 714-720, jul. 1985).

[004]. No homem, a doença ocorre em quatro formas clínicas principais: cutânea localizada, muco-cutânea, cutânea-difusa e visceral. A forma visceral é a mais grave da doença e pode causar febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, chegando a ser fatal se não for tratada (DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Microbiology and Infectious Diseases, v. 27, n. 5, p. 305-318, sept. 2004).

[005]. As principais espécies de *Leishmania* que afetam o ser humano, bem como a forma clínica relacionada a cada espécie são listadas na TABELA 1.

TABELA 1 – FORMAS CLÍNICAS E PRINCIPAIS ESPÉCIES DE *Leishmania* QUE ACOMETEM O HOMEM

<b>Espécie de <i>Leishmania</i></b>	<b>Formas clínicas Habituais</b>	<b>Excepcionalmente</b>
<i>L. donovani</i>	LV, LDPK	LCL
<i>L. infantum</i>	LV	LCL, LCD <sup>a</sup>
<i>L. major</i>	LCL	LCD <sup>a</sup>
<i>L. tropica</i>	LCL	LV
<i>L. aethiopica</i>	LCL	LCD
<i>L. mexicana</i>	LCL	LCD, LV <sup>a</sup>
<i>L. amazonensis</i>	LCL	LCD, LV <sup>b</sup>
<i>L. guyanensis</i>	LCL	
<i>L. panamensis</i>	LCL	LCM, LCD <sup>a</sup>
<i>L. naiffi</i>	LCL	
<i>L. lainsoni</i>	LCL	
<i>L. shawi</i>	LCL	
<i>L. peruviana</i>	LCL	
<i>L. braziliensis</i>	LCL + LCM	LCD <sup>a</sup> , LV <sup>a</sup>

LV: leishmaniose visceral, LCL: leishmaniose cutânea-localizada, LCD: leishmaniose cutânea-difusa, LCM:

muco-cutânea, LDPK: leishmaniose dérmica pós kalazar, a: durante imunossupressão, b: incerto.

[006]. A indução de resposta imune do hospedeiro frente a um antígeno requer uma série de interações complexas entre diferentes tipos celulares (e seus produtos), com a secreção orquestrada de proteínas, receptores de superfície e sinalizações de vias e processos intracelulares ocorrendo todos de maneira altamente especializada (GUERMONPREZ, P. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, v. 20, p. 621-667, oct. 2002). Após a entrada do parasito no hospedeiro, vários mecanismos de defesa são ativados. Dependendo da espécie do parasito e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, a infecção pode causar um espectro de doença que varia de lesões autocicatrizantes a infecções disseminadas e fatais (MOSSER, D. M. et al. *Leishmania* species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *experimental Parasitology*, v. 62, n. 3, p. 394-404, dec. 1986). A incapacidade do hospedeiro em controlar a infecção está aparentemente relacionada a dois fatores principais: a habilidade de algumas cepas de *Leishmania* resistirem aos efeitos microbicidas dos eventos de imunidade inata e adaptativa do hospedeiro, bem como o estabelecimento de um perfil de imunidade celular e humoral pelo hospedeiro vertebrado que favoreça um microambiente apropriado para a instalação do parasito no sistema mononuclear fagocitário (GRIMALDI, G. R.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p. 230-250, jul. 1993).

[007]. O diagnóstico das leishmanioses é baseado nas características clínicas, em critérios epidemiológicos e em resultados de testes de laboratório (GOTO, H.; LINDOSO, A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert*

Review of Anti-infective Therapy, v. 8, n. 4, p. 419-433, apr. 2010). No entanto, não há um método único que possa ser adotado como padrão ouro para o diagnóstico de infecções por *Leishmania spp.* (ANDRADE, A. S. R. et al. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. Acta Tropica, v. 78, n. 3, p. 261-262, mar. 2001; SZARGIKI, R. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 13, n. 1, p. 47-52, feb. 2009).

[008]. Durante a etapa laboratorial de diagnóstico, diversos métodos são aplicados para detectar o parasito e identificar as espécies de *Leishmania*. Os métodos diretos ou parasitológicos isolam o parasito a partir de úlceras na pele (para forma cutânea) ou a partir de medula óssea ou gânglios linfáticos (quando se trata de LV). O material pode ser examinado a fresco (sob um microscópio óptico) ou inoculado em meio de cultura para multiplicação do parasito. O sucesso no achado do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo raro após um ano de infecção. Lesões muito contaminadas com bactérias ou fungos também contribuem para diminuir a sensibilidade do método. Recomenda-se a coleta do material após assepsia local com água e sabão. As espécies de *Leishmania* apresentam capacidade de crescimento variável em cultura e esse método requer uma série de condições laboratoriais, pessoal treinado e alguns dias para a aquisição de um número suficiente de promastigotas para as investigações. Estas características tornam o método de isolamento do parasito em culturas inadequado para o inquérito epidemiológico em larga escala (MONTENEGRO, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. Archives of dermatology and syphilology, v. 13, p. 187, 1926; FURTADO, T. Critérios para diagnóstico de

LTA. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 65, p. 51-86, sept. 1980; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Controle da leishmaniose tegumentar americana, Brasília, 2000).

[009]. A sensibilidade da cultura parasitológica pode reduzir-se em até 80%, quando a infecção passa dos 12 meses.. Os casos crônicos, como aqueles com baixa carga parasitária na lesão, resultam em uma sensibilidade ainda mais reduzida desse método (MONTENEGRO, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. Archives of dermatology and syphilology, v. 13, p. 187, 1926; FURTADO, T. Critérios para diagnóstico de LTA. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 65, p. 51-86, sept. 1980; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Controle da leishmaniose tegumentar americana, Brasília, 2000; LACHAUD, L. et al. Optimised PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. Journal of Clinical Microbiology, v.38, n. 1, p. 236-240, jan. 2000).

[010]. Outra possibilidade para o diagnóstico desta parasitose é o uso de técnicas moleculares que pesquisam fragmentos de DNA do parasito. O ensaio de PCR para *L. infantum* usando sangue periférico como amostra clínica mostrou ser uma alternativa altamente eficiente para o diagnóstico da infecção, exibindo sensibilidades de 82% a 100% e especificidade de 100% (NUZUM, E. et al. Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. Journal of Infectious Diseases, v. 171, n. 3, p. 751-754, mar. 1995; LACHAUD, L. et al. Optimised PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. Journal of Clinical Microbiology, v.38, n. 1, p. 236-240, jan. 2000). No entanto, a parasitemia pode ser episódica podendo acarretar baixa quantidade de parasitos no sangue no momento da coleta e, conseqüentemente, não detecção pela PCR.

Além disso, as técnicas moleculares necessitam de aparatos específicos e não são todos os laboratórios que possuem equipamentos de alta complexidade para realização destas análises (FICHOUX, Y. L. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 1953-1957, jun. 1999).

[011]. O teste de hipersensibilidade tardia da pele (também chamado de Montenegro) é utilizado para forma cutânea. Este teste pode detectar infecção em algumas semanas e avalia a imunidade celular. No entanto, é sabido que os testes que utilizam promastigotas ou proteínas solúveis do parasito como fonte de antígeno sensibilizador podem limitar a especificidade do teste e/ou aumentar os problemas com a produção de preparações antigênicas (MONTENEGRO, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives of dermatology and syphilology*, v. 13, p. 187, 1926; GONTIJO, C. M. F. e MELO, M. N. leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7 n. 3, p. 338 – 349, sep. 2004).

[012]. Os exames de sangue que detectam anticorpos (resposta imune humoral) também são úteis. Muitos estudos foram realizados no sentido de avaliar métodos de diagnóstico para leishmaniose. Essas pesquisas enfatizaram a necessidade de associação de duas ou mais técnicas indiretas para o diagnóstico da referida parasitose para a realização de um diagnóstico preciso (FABER, W. R. et al. Value diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, n. 49, p. 70-74, jul. 2003; MARQUES-DA-SILVA, E. A. et al. Intramuscular immunization with P-36 (LACK) DNA vaccine induces a type 1 response but do not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge.

Parasitology Research, v. 98, n. 1, p. 67-74, nov. 2005; SZARGIKI, R. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 13, n. 1, p. 47-52, feb. 2009).

[013]. O teste de ensaio imuno-enzimático (ELISA) para diagnóstico da leishmaniose é considerado um teste rápido, sensível para detecção de anticorpos e facilmente automatizável. Estudos visando o aprimoramento desta metodologia e empregando antígenos purificados vêm sendo desenvolvidos para que se possa obter uma forma rápida, segura e eficaz o diagnóstico dessa doença (PORROZZI, R. et al. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* visceral Infections in Dogs. Clinical and vaccine immunology, v. 14, n. 5, p. 544-548, may 2007; OLIVEIRA, S. G. G. et al. Characterization of Novel *Leishmania infantum* Recombinant Proteins Encoded by Genes from Five Families with Distinct Capacities for Serodiagnosis of Canine and Human visceral Leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 85, n. 6, p. 1025-1034, dec. 2011; COSTA, M. M. et al. Improved Canine and Human visceral Leishmaniasis Immunodiagnosis Using Combinations of Synthetic Peptides in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 6, n. 5, p. 1622, may. 2012; FUMAGALLI, M. A. C. Proteção contra a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por Phage display e spot synthesis. 85 f. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008).

[014]. Avanços foram realizados no que diz respeito

ao diagnóstico e à prevenção da leishmaniose durante a última década. Entretanto, ainda não há um método único que possa ser adotado como padrão, quer seja para o diagnóstico ou ainda para prevenção da doença (ANDRADE, A. S. R. et al. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica*, v. 78, n. 3, p. 261-262, mar. 2001). Dentro deste contexto torna-se necessária a busca por antígenos purificados, de alta sensibilidade e segurança para o diagnóstico e prevenção da doença.

[015]. Uma técnica que permite a busca de alvos antigênicos é a técnica de *Phage display* que se destaca na seleção de mimotopos (sequências proteicas que apresentam similaridades com o epítipo original) ou epítipos contínuos e descontínuos baseados na reação antígeno-anticorpo. Uma vez que bacteriófagos de uma biblioteca conhecida sejam selecionados pelos anticorpos presentes no soro de pacientes com determinada doença, o seu DNA pode ser extraído e seqüenciado. O peptídeo identificado pode ser sintetizado quimicamente para uso em imunizações e imunodiagnósticos (SOMPURAM, S. R. et al. Synthetic peptides identified from phage-displayed combinatorial libraries as immunodiagnostic assay surrogate quality-control targets. *Clinical Chemistry*, v. 48, n. 3, p. 410-420, mar. 2002; COELHO, E. A. F. et al. Immune responses induced by *Leishmania (Leishmania) donovani* A2, but not by LACK antigen, are protective against experimental *L. (L.) amazonensis* infection. *Infection Immunology*, v. 71, n. 7, p. 3988-3994, jul. 2003; HAMBY P. G. et al. Use of peptide library screening to detect a previously unknown linear diagnostic epitope: Proof of Principle by Use of Lyme Disease Sera. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 12, n. 7, p. 801-807, jul. 2005; SHARMA, A. et al. Specific and randomly derived immunoactive peptide mimotopes of mycobacterial antigens. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, n. 10,

p. 1143-1154, oct. 2006; GAUCI, C. et al. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis by immunization with novel recombinant antigens. *Vaccine*, v. 30, n. 26, p. 3824-3828, jun. 2012).

[016]. Considerando a multiplicidade de fatores que envolvem a transmissão da leishmaniose, nota-se a dificuldade para se formular estratégias eficientes para o controle dessa doença. Neste sentido, progressos ocorrem nos estudos de novos antígenos candidatos a vacinas contra a leishmaniose, visto que a imunoprevenção é reconhecida mundialmente por ser uma forma segura e eficaz de levar o sistema imunológico a desenvolver defesa contra determinados agentes patogênicos.

[017]. O tratamento de primeira escolha para leishmaniose tegumentar americana é o antimonial pentavalente. Embora este tratamento seja na maioria das vezes efetivo e indicado, devem ser consideradas as desvantagens tais como efeitos colaterais, longa duração do tratamento e contra-indicação para cardiopatas, nefropatas, idosos e grávidas (MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 1, p. 14-21, feb. 2006).

[018]. Os primeiros estudos buscando vacinas para o tratamento de leishmaniose são datados do início do século, quando foram cultivadas e esterilizadas cepas de *Leishmania tropica* (originárias de infecções experimentais de macacos) que compuseram uma vacina aplicada em indivíduos com lesões características de leishmaniose. A análise dos resultados demonstrou que o tratamento foi bem sucedido, pois proporcionou a cura dos casos (ROW, R. Curative value of *Leishmania* culture vaccine in Oriental sore. *British medical journal*, v. 9, p. 540-541, 1912).

[019]. Um protocolo para imunoterapia foi testado por Mayrink e colaboradores administrado-se a indivíduos com LTA doses crescentes a uma vacina composta por promastigotas mortos. Séries de 10 dias de tratamento, foram aplicadas até se observar a cura completa dos indivíduos. Dos 122 pacientes participantes, 60 receberam a vacina e os demais foram tratados com a quimioterapia convencional. Os resultados deste ensaio confirmam que 95% dos pacientes tratados com a vacina foram curados após um máximo de 20 séries (400 dias). Mais uma vez, a imunoterapia provou ser uma alternativa de tratamento eficaz para a LTA, especialmente quando a quimioterapia convencional não é recomendada (MAYRINK, W. et al. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana utilizando vacina. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v. 66, p. 55-59, 1991).

[020]. Mais recentemente demonstrou-se que a associação do antimônio com a vacina (imunoquimioterapia) apresentou alto índice de cura (100%). Também verificou-se que a aplicação da vacina reduziu o volume do sal em 17,9% e o tempo de cura de 87 para 62 dias; conseqüentemente, reduzindo os efeitos colaterais (MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 1, p. 14-21, feb. 2006).

[021]. Deve ser considerado ainda o uso de vacina anti-Leishmania em pacientes que apresentam co-morbidades. A ocorrência de leishmaniose em pacientes com HIV ou hanseníase tem aumentado, sendo que estes pacientes são geralmente resistentes à quimioterapia convencional e apresentam maus prognósticos na maioria dos casos. Pacientes HIV positivos e com LTA foram tratados com imunoterápicos e em todos os casos de regressão da lesão foi

alcançado com êxito (HERMETO, M. V., et al. Antimony-resistant American Cutaneous Leishmaniasis treated with immunotherapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; v. 87, n.1, p.187, 1992; CUNHA, R. M. C. et al. leishmaniose disseminada em paciente infectado pelo vírus HIV. Evolução clínico-morfológica atípica. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 27, n. 1, p. 389, 1994). Já em pacientes com associação de leishmaniose e hanseníase (formas virchowiana e indeterminada) três doses de vacina combinada com BCG em um período de três meses foram necessários para induzir a cura completa das lesões (SILVEIRA, F. T., MAYRINK, W. leishmaniose cutânea anérgica difusa no Estado do Pará, Brasil: Relato da cura de um caso depois de 24 anos de doença, após tratamento combinado de quimioterapia com imunoterapia. XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte, MG, Brasil, pôster 42, p.129, 1997).

[022]. O arsenal terapêutico da LTA é muito restrito já que as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade e nenhuma delas é eficaz. A recidiva, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca de uma droga ideal. Neste sentido é desejável a realização de pesquisas que visem à cura da doença de forma mais rápida e com poucos efeitos colaterais.

[023]. Desta forma, fica evidente a necessidade da identificação de novas biomoléculas capazes de gerar uma resposta imunogênica não apenas em humanos que já possuam a doença, mas também em pessoas que estejam em áreas endêmicas, mas que ainda não apresentem sintomas. Com isso, é possível controlar a doença por três vias: diagnóstico precoce, profilaxia e tratamento.

#### **Estado da Arte**

[024]. Várias estratégias têm sido utilizadas na

identificação de antígenos para uso no diagnóstico da leishmaniose.

[025]. Em FARGEAS, C. et al. Synthetic Peptide-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 241-248, feb. 1996 é descrito um teste de ELISA com antígenos para LV, por clonagem, que atingiu uma sensibilidade de 71% e uma especificidade de 93%. Já em PASSOS, S. et al. Recombinant *Leishmania* Antigens for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 12, n. 10, p. 1164-1167, oct. 2005 é descrito um antígeno (KPM11) que possui 100 % de sensibilidade e especificidade para a mesma doença. Em KUMAR, S. et al. Identification and Characterization of a Novel *Leishmania donovani* Antigen for Serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 86, n. 4, p. 601-605, apr. 2012 é obtido um antígeno, por meio de SDS PAGE, que deu sensibilidade e especificidade ao teste de 95 e 100%, respectivamente.

[026]. Tanto em OLIVEIRA, S. G. G. et al. Characterization of Novel *Leishmania infantum* Recombinant Proteins Encoded by Genes from Five Families with Distinct Capacities for Serodiagnosis of Canine and Human visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 6, p. 1025-1034, dec. 2011, por meio de clonagem, quanto em COSTA, M. M. et al. Improved Canine and Human visceral Leishmaniasis Immunodiagnosis Using Combinations of Synthetic Peptides in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 5, p. 1622, may. 2012, por meio de predição de epítipo de células B, foram estudados testes sensíveis a LV e leishmaniose canina. Destes dois estudos o melhor resultado foi observado por Costa, atingindo 71% e 81% de sensibilidade e 100% de especificidade para LV e leishmaniose

canina, respectivamente.

[027]. Já em PORROZZI, R. et al. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Based on Crude and Recombinant Leishmanial Antigens for Serodiagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania infantum* visceral Infections in Dogs. *Clinical and vaccine immunology*, v. 14, n. 5, p. 544-548, may 2007, por meio de clonagem, e em FARIA, A. L. et al. High-Throughput Analysis of Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Canine visceral Leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 9, p.1310, sept. 2011, e FUMAGALLI, M. A. C. et al. Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 20, n. 6, p. 835-841, jun. 2013, por meio de predição de epítipo de células B, foram estudados antígenos para leishmaniose canina. Nenhum deles foi capaz de apresentar um teste com sensibilidade superior a 88% e especificidade superior a 98%.

[028]. Com relação ao desenvolvimento de vacinas para a leishmaniose, pode-se dizer que a vacinação contra a leishmaniose humana tem sido praticada há séculos. No entanto, os primeiros estudos vacinais publicados foram realizados nos países asiáticos, onde foram inoculadas cepas vivas virulentas de *L. major* na população, prática conhecida como leishmanização, cujo objetivo seria a atingir imunidade duradoura após a cura da lesão, o que foi eficaz na leishmaniose cutânea no Velho Mundo. Nas inoculações efetuadas em pessoas observou-se o aparecimento de lesões menores seguidas de recuperação dos pacientes. No entanto, vários problemas impedem o uso generalizado deste procedimento, incluindo a parte logística, dificuldade de padronização de virulência das cepas e ocasionais lesões persistentes graves, resultantes da inoculação da

vacina (NADIM, A. Immunity to Cutaneous Leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 78, n. 6, p. 848, 1984; KHAMESIPOUR, A. et al. Use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. Vaccine, v. 28, n. 23, p. 3642-3248, may 2005).

[029]. Muitas das vacinas testadas atualmente utilizam parasitos mortos (vacinas de primeira geração). Os primeiros ensaios clínicos de imunização com promastigotas de *Leishmania* mortos contra leishmaniose no Brasil são datadas de 1939, quando Salles-Gomes e Pessoa imunizaram determinada população com este tipo de preparação. Os resultados sugeriram um efeito protetor do esquema vacinal com diminuição do tamanho das lesões nos indivíduos imunizados. Estimulados com os resultados, novos testes contra a LTA em humanos foram desenvolvidos. Uma suspensão de formas promastigotas dermatrópicas de *Leishmania* sp. preparadas em solução fenolada foi administrada intramuscularmente em voluntários. Após 20 meses de observação encontrou-se nos indivíduos controle negativos um índice de desenvolvimento da doença da ordem de 18%, enquanto que entre os vacinados somente 3,2% adoeceram (PESSOA, S. B, PESTANA, B. R. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germes mortos. Revista de Biologia e Higiene, v. 10, p. 112-118, 1941).

[030]. Os estudos de Pessoa e colaboradores foram seguidos muito mais tarde por uma série de ensaios realizados por Mayrink e colaboradores (1979). Algumas modificações foram introduzidas no protocolo de vacinação (incluindo a diminuição do número de cepas de *Leishmania*) e também na preparação da suspensão. Desta forma, apenas cinco cepas dermatrópicas (isoladas de diferentes áreas no Brasil) foram usadas, a sonicação dos parasitos

foi também introduzida e o teor de nitrogênio total foi usado como uma forma de normalizar as preparações.

[031]. O grupo de Mayrink e colaboradores utilizaram esta vacina em militares da Amazônia (área de alto risco para leishmaniose). Observou-se redução de 67,3% em 1980 e 7% em 1983 na incidência da doença entre os indivíduos vacinados que passaram a apresentar Teste de Montenegro (IDR) positivo. Também foi sugerido que o teste intradérmico (IDR), em humanos, seria um importante indicador da resposta imune o que, de certa forma, refletiria um estágio de proteção. Nenhum efeito de exacerbação da doença foi observado (ANTUNES, C. M. F. et al. Controlled field trials of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis. *The International Journal of Epidemiology*, v.15, n.4, p. 572-580, dec.1986).

[032]. O estudo do grupo de pesquisa supracitado também revelou que a vacinação aumenta a proliferação de linfócitos e a respostas de células mononucleares do sangue periférico, quando em comparação com os indivíduos controles não vacinados. Observaram também correlação de 90% destes resultados com o teste cutâneo positivo. Os ensaios demonstraram que o soro de indivíduos vacinados reconheceu oito principais antígenos com massas moleculares estimadas em 13,5, 25, 40, 63, 73, 85, 97 e 160 kDa (NASCIMENTO, E. et al. Vaccination of Humans against Cutaneous Leishmaniasis: Cellular and Humoral Immune Responses. *Infection and immunity*, v. 58, n. 7, p. 2198-2203, jul. 1990).

[033]. Em 1985, resultados de uma campanha de vacinação durante epidemia de LTA na cidade de Viana no Espírito Santo revelaram diferenças estatisticamente significantes nos níveis de infecção entre os grupos vacinados e não vacinados, com 87,6% dos indivíduos vacinados apresentando Teste de Montenegro positivo após

a vacinação (MAYRINK, W. et al. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 79, n. 3 p. 259-269. jun. 1985). Apesar dos ótimos resultados obtidos com a campanha, críticas foram feitas quanto à sua composição e identificação das cepas que compunham a suspensão vacinal, já que as várias cepas de *Leishmania* não eram bem caracterizadas, o que levavam a dificuldades de fabricação e padronização da vacina.

[034]. Reuniões científicas foram organizadas para analisar a estratégia vacinal adequada para pesquisas e a formulação da vacina utilizando somente uma cepa de *L. amazonensis*. Também foi decidido que a Biobrás SA (indústria farmacêutica interessada na produção e comercialização do produto) produziria a vacina incluindo no processo as boas práticas de fabricação. Ensaio de Fase I foram realizados no Rio de Janeiro. De acordo com avaliações clínicas e laboratoriais realizadas, apesar da alta concentração de proteína total por imunização, concluiu-se que a vacina era inócua se aplicada, e ensaios de Fase II foram iniciados (MARZOCHI, K. B. F. et al. Phase I studies for the Leishvacin (Killed Leishmanix vaccine) in Brazil. Workshop on vaccine efficacy trial against Leishmaniasis, 1995). Esta vacina foi testada com o uso de adjuvantes em 56 voluntários saudáveis que receberam vacina e placebo ou rhGM-CSF (Fator recombinante humano estimulante colônias de granulócitos macrófagos). Os níveis de IFN-gama e IL-5 foram significativamente aumentados no grupo que recebeu a vacina. O grupo que recebeu apenas adjuvante teve resposta significativa à vacinação, comparado ao grupo placebo (86% de todos os voluntários foram IDR positivo no dia 42). A utilização de rhGM-CSF melhorou a resposta imune indicando que ele poderia otimizar a resposta imunológica à vacina (FOLLADOR, I. et al. Immune

responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine*, v. 31, p. 1365-1368, jan. 2002). Apesar de todos os esforços ainda não existe uma vacina para leishmaniose humana em utilização.

[035]. O uso de organismos atenuados ou produtos parasitários é uma abordagem que visa evitar os perigos e as inconveniências do emprego de parasitos infectantes. Em relação aos imunobiológicos da segunda geração, protocolos vêm sendo desenvolvidos e/ou testados em diversos países, mas até o presente, nenhum foi comprovado ser satisfatoriamente eficaz ou viável (VELEZ, I. D. et al. Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous. *Vaccine*, v. 28, n. 1, p. 329-337, dec. 2010; FUMAGALLI, M. A. C. et al. Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 20, n. 6, p. 835-841, jun. 2013).

[036]. Apesar da existência de inúmeros estudos visando a profilaxia da leishmaniose humana, muitas lacunas ainda precisam ser preenchidas. Dentre as vacinas de segunda geração testadas para leishmaniose as que se destacam são descritas a seguir.

[037]. Em SPITZER, N. et al. Long-term protection of mice against *Leishmania major* with a synthetic peptide vaccine. *Vaccine*, v. 17, n. 11, p. 1298-1300, mar. 1999 é utilizado o antígeno GP63, obtido por meio de clonagem de antígenos de *L. major* em camundongos Balb/c. Com este antígeno, foi alcançada uma proteção (ausência de lesões) por 10 meses após o desafio.

[038]. O estudo COELHO, E. A. F. et al. Immune responses induced by *Leishmania (Leishmania) donovani* A2, but not by

LACK antigen, are protective against experimental *L. (L.) amazonensis* infection. *Infection Immunology*, v. 71, n. 7, p. 3988-3994, jul. 2003 utiliza os antígenos LACK e A2, obtidos por meio de clonagem de antígenos de *L. donovani* em camundongos BALB/c. Neste estudo, foi observada uma proteção com altos níveis de IFN- $\gamma$  e baixos de IL-4, além de anticorpos específicos e diminuição na quantificação parasitária. No entanto, foi observada apenas proteção com A2 e não com LACK, quando o desafio foi realizado com outras cepas de *Leishmania*.

[039]. Em SALAY, G. et al. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clinical Vaccine Immunology*, v. 14, n. 9, p. 1173-1181, sep. 2007 são descritas 4 proteínas diferentes, obtidas por meio de clonagem de *L. braziliensis* em camundongos Balb/c. Não foi observada proteção ou diminuição no tamanho e número de lesões características, bem como não houve estímulo na produção de IFN- $\gamma$ .

[040]. Em FUMAGALLI, M. A. C. Proteção contra a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por Phage display e spot synthesis. 85 f. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008 são sintetizados peptídeos, por meio da técnica de *Phage Display* de *L. amazonensis* em camundongos Balb/c. Os alvos testados foram protegidos, com produção elevada de IFN- $\gamma$ , porém com baixos níveis de IL-4, IL-10 e anticorpos específicos nos animais vacinados.

[041]. A patente US5674503, depositada em 21/09/1994, descreve peptídeos imunogênicos para leishmaniose, sendo que a proteína gp64 é citada como uma delas. No entanto, as

sequências de aminoácidos descritas são diferentes daquelas apresentadas na presente patente de invenção.

[042]. A patente WO2006058243, depositada em 23/11/2005, cita uma formulação útil para aumentar a resposta imune a antígenos de *Leishmana*, compreendendo antígenos tais como GP46, P4, GP63, p36-LACK e P8. No entanto, os epítodos destes antígenos são diferentes dos apresentados na presente patente de invenção.

[043]. As medidas de controle da leishmaniose até agora implementadas foram incapazes de eliminar ou diminuir a transmissão e impedir a ocorrência de novas epidemias. Já os métodos disponíveis para o diagnóstico e as pesquisas visando imunoprevenção da leishmaniose ainda não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejadas, embora avanços promissores tenham sido alcançados com as pesquisas de novos testes. Considerando o exposto, fica evidente a necessidade de produção de antígenos purificados, de alta sensibilidade e segurança para a prevenção da leishmaniose.

#### **Descrição Resumida da Invenção**

[044]. A presente patente de invenção tem como objetivo proteger peptídeos sintéticos, obtidos por meio da técnica de *Phage Display*, contendo mimotopos ou epítodos que tenham potencial para diagnóstico sorológico e também para ativar linfócitos. Esta última propriedade é de particular importância, uma vez que os peptídeos sintéticos podem ser também utilizados em protocolos vacinais. O termo "mimotopo" se refere a um peptídeo selecionado de bibliotecas randômicas expressas em fagos que mimetiza a estrutura de um epítodo. Enquanto, o termo "antígeno" se refere a qualquer substância que induz uma resposta imune envolvendo células T ou B.

[045]. Desta maneira, a invenção fornece sequências de aminoácidos na forma de peptídeos que podem ser empregadas

em diferentes apresentações como em método e *kit* de diagnóstico ou em composições imunológicas.

[046]. A invenção fornece um método de diagnóstico para doenças infecciosas relacionadas à *Leishmanias*, esse método compreende os seguintes passos:

- a) Coleta da amostra;
- b) Colocar a amostra, após processamento, em contato com pelo menos um dos peptídeos identificados;
- c) Detecção da ligação entre peptídeos e componentes da amostra.

[047]. A presente invenção também faz vistas ao desenvolvimento de *kit* de diagnóstico para doenças infecciosas causadas por *Leishmanias*. Esse *kit* de diagnóstico compreende pelo menos um dos peptídeos identificados e reagentes de detecção da reação entre antígeno e componentes da amostra obtida de indivíduos.

[048]. A presente invenção também se refere a composições imunológicas que tenham como princípio ativo pelo menos um dos peptídeos identificados associado a um ou mais veículos fisiologicamente aceitáveis ou adjuvantes.

[049]. Outro aspecto da presente invenção compreende a utilização dos peptídeos aqui citados em biosensores, para detecção de infecção com *Leishmania*.

#### **Citação das Figuras**

[050]. As figuras em anexo servirão para proporcionar um melhor entendimento do processo de identificação de peptídeos derivados de bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos e seus usos. Deve-se ressaltar que o processo não é limitado a espécie *L. braziliensis*, mas é estendido as demais espécies de *Leishmania*.

[051]. A FIGURA 1 ilustra as bandas obtidas pelo SDS-PAGE dos antígenos solúveis de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Colunas: 1 – Padrão de massa molecular; 2 - *L. braziliensis*; 3 - *L. amazonensis*. Vinte microgramas de proteína foram aplicados em cada canaleta de um gel de poliacrilamida a 15%, posteriormente foi adicionado o soro de pacientes com LTA e finalmente o gel foi corado por nitrato de prata.

[052]. A FIGURA 2 ilustra as bandas obtidas pelo SDS-PAGE de IgGs totais de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar purificadas por precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de afinidade. Colunas: 1 – Padrão de massa molecular; 2 – IgGs totais precipitadas por sulfato de amônio em condições não redutoras; 3 – IgGs totais purificadas por cromatografia de afinidade sob condições não redutoras; 4 – IgGs totais purificadas por cromatografia de afinidade sob condições redutoras. Três microgramas de proteína foram aplicados em cada canaleta de um gel de poliacrilamida a 10% corado por azul de Coomassie.

[053]. A FIGURA 3 ilustra a reatividade de IgGs totais de pacientes com LTA frente a antígenos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* - reação observada em *western blotting*. Padrão de massa molecular (coluna 1). Quarenta microgramas de antígeno de *L. braziliensis* (colunas 2 e 3) e *L. amazonensis* (colunas 4 e 5) foram separados por SDS-PAGE a 15%. Foi realizado *Western Blotting* com soro humano positivo para leishmaniose tegumentar diluído 1:50 (colunas 2 e 4) e 40 µg/mL de IgGs totais (colunas 3 e 5). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humana conjugado à peroxidase e usando DAB como cromógeno.

[054]. A FIGURA 4 ilustra a reatividade das imunoglobulinas antígeno-específicas por ELISA. Uma placa foi

sensibilizada com 5 µg/mL de antígeno de *L. braziliensis* e incubada com imunoglobulinas partindo-se de 100 µg/mL para a total (barras claras) e 10 µg/mL para imunoglobulinas antígeno-específicas (barras escuras). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humana Fc-específica conjugada à peroxidase e OPD como cromógeno.

[055]. A FIGURA 5 ilustra (A) placa apresentando a reação antígeno anticorpo pela técnica ELISA demonstrando o aumento da reatividade a cada ciclo de seleção (B) - absorbância obtida de cada ciclo de seleção empregando-se o teste ELISA. Uma placa para ELISA foi sensibilizada com 5 µg/mL de anti-fago e incubada com fagos (109/cavidade) dos ciclos I, II, III, IV. Posteriormente se adicionou anticorpos anti - *L. braziliensis*. A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG humana Fc-específica, conjugada à peroxidase e com OPD como cromógeno. C: controle (Fago silvestre).

[056]. A FIGURA 6 ilustra a produção de IgG no soro de hamsters imunizados com o peptídeo 1, 2, 3 ou com um mix dos três peptídeos por ELISA. Não imune: Foi adicionado soro do grupo de animais que não receberam imunizações, Adj: Foi adicionado soro do grupo de animais que recebeu imunizações somente com adjuvante, P1: Foi adicionado soro do grupo de animais imunizados com o peptídeo 1 e adjuvante, P2: Foi adicionado soro do grupo de animais imunizados com o peptídeo 2 e adjuvante, P3: Foi adicionado soro do grupo de animais imunizados com o peptídeo 3 e adjuvante, Pep 1, 2, 3 (MIX): Foi adicionado soro do grupo de animais imunizados com os peptídeos 1, 2, 3 e adjuvante. A sensibilização das placas de ELISA foi realizada com 0,2 µg/ml dos peptídeos 1, 2, 3 ou com o MIX dos três. Foram aplicadas amostras de soro de hamsters dos diferentes grupos experimentais, na diluição 1:50 (poll dos dez animais de cada grupo). A

detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG total de hamster ligada a peroxidase (200 ng/mL) e OPD como cromógeno.

[057]. A FIGURA 7 ilustra a reatividade de IgGs de hamsters inoculados com peptídeos frente a antígenos de *L. braziliensis* por *western blotting*. Trinta microgramas de antígeno de *L. braziliensis* foram separados por SDS-PAGE a 15% e após *Western Blotting* reagidos com soro de hamster diluído 1:100 (pool de soro hamster que recebeu peptídeo 1 na canaleta 1, peptídeo 2 na canaleta 2, peptídeos 3 na canaleta 3, MIX dos três peptídeos na canaleta 4, na canaleta 5 foi adicionado o soro dos hamsters que receberam somente adjuvante e na canaleta 6 o soro dos hamsters que não receberam nenhuma inoculação). A detecção da reação foi realizada com anticorpo anti-IgG de hamster conjugada à peroxidase (100 µg/mL).

#### **Descrição Detalhada da Invenção**

[058]. A presente invenção consiste em peptídeos cuja aplicação compreende métodos de diagnóstico e profilaxia de Leishmaniose. Tais peptídeos foram obtidos a partir da identificação de mimotopos específicos de antígenos de leishmania por meio da técnica *Phage Display*, uma metodologia de apresentação de peptídeos ou proteínas, incluindo anticorpos, na superfície de fagos filamentosos. Essa técnica permite o estudo de interações proteína-ligante, pode ser usada no mapeamento de epítomos de anticorpos monoclonais e policlonais, como também, na identificação de ligantes para receptores e na seleção de substratos para enzimas (Azzazy H. M., Highsmith W.E Jr., *Clin. Biochem.*, 35: 425-445, 2002).

[059]. A técnica de *Phage Display* se apresenta com uma alternativa de identificação de antígenos de Leishmania seja para uso em diagnóstico, na imunoterapia, em vacinas, ou em imunizações, uma vez que os métodos até então utilizados, como descritos no estado

da arte, não são abrangentes para todas as espécies de *Leishmania*, em especial à *L. braziliensis*.

[060]. Além disso, os métodos utilizados até o momento se basearam no conhecimento prévio de antígenos para a caracterização de novos reagentes de diagnóstico. Uma vantagem da técnica de *Phage Display* é não requerer a identificação prévia do antígeno natural contra o qual uma resposta imune é dirigida (Azzazy H. M., Highsmith W.E Jr., *Clin. Biochem.*, 35: 425-445, 2002).

[061]. Deste modo, bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos foram rastreadas usando anticorpos e mais especificamente, anticorpos antígeno-específicos.

[062]. Os anticorpos antígeno-específicos podem ser obtidos não exclusivamente de amostras de indivíduos infectados, mas podem ser obtidos de amostras de animais experimentalmente infectados.

[063]. O termo "amostra" se refere a uma variedade de tipos de amostra obtidos de indivíduos como, sangue, soro, plasma e outras amostras de origem biológica.

[064]. Amostras de sangue de origem humana ou animal podem ser processadas para separação dos anticorpos por procedimentos já conhecidos do estado da técnica como centrifugação ou além processadas por procedimentos adicionais como precipitação e/ou cromatografia de afinidade para separação de subclasses específicas de imunoglobulinas. Mais além, anticorpos podem ser separados por ligação a uma coluna imobilizada com antígeno ou ainda anticorpos podem ser separados de *immunoblots* (Harlow E., Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.).

[065]. Os anticorpos usados na presente invenção para a seleção de peptídeos de bibliotecas de fagos foram provenientes de amostras de soro de diferentes indivíduos portadores de LTA.

[066]. Anticorpos antígeno-específicos denotam, na presente invenção, anticorpos obtidos de soro de pacientes que são submetidos à precipitação com sulfato de amônio com subsequente purificação por cromatografia de afinidade em proteína-G e além purificados frente a antígenos de *Leishmania spp* após *immunoblotting*. Porém, a obtenção de anticorpos antígeno-específicos não está limitada a esse exemplo, mas pode envolver o uso de um ou a combinação de dois ou mais procedimentos conhecidos do estado da técnica. Como também, os anticorpos obtidos não são limitados à classe IgG, mas podem compreender as demais classes e suas subclasses.

[067]. O emprego de tais anticorpos antígeno-específicos para seleção de peptídeos em bibliotecas de fagos possibilita maior oportunidade de encontrar peptídeos miméticos (mimotopos) de antígenos de *Leishmania*.

[068]. Bibliotecas de fagos foram rastreadas usando anticorpos antígeno-específicos de *Leishmania spp.* como também as mesmas bibliotecas foram rastreadas usando anticorpos antígeno-específicos de *Leishmania spp.*. Nesse último caso, os fagos não ligados aos anticorpos de pacientes com Leishmaniose foram subsequentemente usados com os anticorpos antígeno-específicos de *Leishmania spp.*, a fim de prevenir a seleção de mimotopos inespecíficos.

[069]. Através da tecnologia *Phage Display* clones de fagos/peptídeos foram selecionados por reconhecer anticorpos de pacientes com Leishmaniose.

[070]. Os peptídeos identificados compreendem mimotopos ou também chamados mimotipos, pois não são epítomos naturais, mas são epítomos que mimetizam parte do epítomo natural. O mimetismo se deve a similaridade na sequência ou a similaridade em propriedades físico-químicas e na organização especial (Moreau V. *et al.*, *Bioinformatics*, 22: 1088-1095, 2006).

[071]. Dentre os objetivos da presente invenção foi avaliar se os peptídeos identificados, que foram, por sua vez, selecionados de bibliotecas de peptídeos expressa em fagos, possuíam a capacidade de reagir com anticorpos do soro de pacientes com Leishmaniose.

[072]. A capacidade dos peptídeos de reagir com anticorpos destes pacientes foi demonstrada na presente invenção. A análise compreende a incubação da amostra, preferencialmente soro, proveniente de indivíduos com leishmaniose na presença de um ou mais peptídeos. A ligação do anticorpo da amostra com o(s) peptídeo(s) é então detectada. Subentende-se que além do soro, outras amostras de origem biológica que contenham anticorpos podem ser empregadas na análise.

[073]. Os peptídeos podem ser empregados individualmente ou combinados. O termo "combinados" se refere a uma composição formada por duas ou mais sequências listadas na tabela 3. O termo "combinados" também se refere a polímero de peptídeos, que por sua vez, trata-se de um peptídeo mais longo formado pela repetição de uma sequência peptídica podendo ou não ser separada por espaçadores ou *linkers*. Quando presentes os

espaçadores ou *linkers* podem estar localizados entre algumas sequências ou entre todas as sequências de peptídeos. O polímero pode ser constituído de qualquer sequência peptídica e ainda o polímero pode compreender diferentes combinações de sequência de peptídeos. Portanto, um polímero pode ser formado por uma ou mais repetições da primeira sequência, seguido por uma ou mais repetições da segunda sequência de peptídeos.

[074]. As sequências de peptídeos que trata a presente invenção podem sofrer modificações originando variantes, desde que essas formas variantes mantenham as características antigênicas e/ou imunogênicas das sequências originais das quais derivaram.

[075]. O termo antigênico se refere a capacidade do antígeno de reconhecer o anticorpo ou receptor de célula T, enquanto, o termo imunogênico refere-se a capacidade de induzir uma resposta imune humoral e/ou celular.

[076]. As modificações incluem, porém não limitadas a essas, acetilação, amidação, formilação, biotinilação, fosforilação, succinilação, sulfurilação, adição de um ou mais ácidos graxos, adição de um ou mais corantes como AMC (7-amino-4-metil-cumarina), Cy3, Cy5, Dabcyl, Dansyl, DNP (2,4-dinitrofenil), DNP-lisina, EDANS (5-2((2-aminoetil)amino)naftaleno-1-ácido sulfônico), fluoresceína, NBD (7-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol), p-nitro-anilina, rodamina B e Tmra, substituição de um ou mais aminoácidos por outro de ocorrência natural, substituição de um ou mais aminoácidos por aminoácidos não naturais ou especiais como, citrulina, ornitina,  $\epsilon$ -acetil-lisina,  $\beta$ -alanina, ácido aminobenzóico, ácido 6-aminocapróico, ácido aminobutírico, dimetil-lisina, hidroxiprolina, ácido mercaptopropiônico, metil-lisina, 3-nitro-tirosina, norleucina, ácido piroglutâmico, carbobenzoxil e muitos

outros, adição de um ou mais aminoácidos de ocorrência natural, adição de um ou mais aminoácidos não naturais ou especiais, substituição de um ou mais aminoácidos por aminoácidos pesados, adição de um ou mais aminoácidos pesados, substituição de um ou mais aminoácidos por D-aminoácidos, adição de um ou mais D-aminoácidos, ciclização, adição de espaçadores ou *linkers*, adição de uma ou mais pontes dissulfeto, adição de polietilenoglicol (PEG), marcação com isótopos radioativos, substituição de um ou mais aminoácidos por N-metil aminoácidos, adição de um ou mais N-metil aminoácidos e deleção de um ou mais aminoácidos.

[077]. Outra modificação é a conjugação dos peptídeos a proteínas carreadoras como albumina soro bovina (BSA), ovalbumina, KLH (*keyhole limpet hemocyanin*), toxóide difitérico, toxóide tetânico, etc. Vários métodos são disponíveis para a conjugação de peptídeos a proteína como, por exemplo, conjugação via EDC, conjugação via MBS e conjugação via glutaraldeído.

[078]. Outra modificação que podem ser encontrada em peptídeos é a formação de MAPs (*Multiple Antigen Peptides*), que se caracterizam por utilizar  $\alpha$  e  $\beta$ -amino grupos de lisina para formar um esqueleto ao qual múltiplas cadeias de peptídeos podem ser fixadas. Os MAPs são uma alternativa a conjugação de antígenos a proteínas carreadoras.

[079]. Ressalta-se que quando as sequências peptídicas são usadas individualmente ou combinadas refere-se ao emprego tanto das sequências originais como das sequências variantes.

[080]. Os peptídeos (sequências originais ou variantes) podem ser produzidos pela tecnologia do DNA recombinante ou por síntese química e ambos os métodos são conhecidos do estado da técnica.

[081]. Um objetivo da presente invenção é fornecer um método de diagnóstico de infecção por *Leishmania spp.*. Para tanto, pelo menos um dos peptídeos (isolado ou combinado) é imobilizado em um suporte sólido e após colocar em contato a amostra contendo anticorpos obtida de indivíduos com o(s) peptídeo(s) a ligação entre anticorpo e peptídeo(s) é detectada.

[082]. O antígeno, que corresponde a pelo menos um dos peptídeos, é colocado em contato com um suporte sólido para que possa se ligar e ficar adsorvido a esse suporte. Os suportes sólidos incluem microplacas de 96 poços de poliestireno ou polivinil cloreto (PVC), membranas de nitrocelulose, fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou *nylon*, esferas de poliestireno ou agarose, vidro, entre outros. O antígeno imobilizado é colocado em contato com a amostra contendo anticorpos para interação. Moléculas que não especificamente interagiram com o antígeno ligado ao suporte sólido são removidas por lavagens com soluções tampão adequadas. Para a detecção da interação entre antígeno e anticorpo um segundo anticorpo (anticorpo secundário) marcado é adicionado. O suporte sólido pode ser novamente lavado para a remoção de anticorpos não ligados. A reação entre antígeno e anticorpo é revelada por um método, que depende da marcação empregada, de modo a produzir um sinal detectável ou mensurável. A intensidade do sinal indica a quantidade de anticorpo na amostra.

[083]. O anticorpo que reconhece o antígeno é chamado de anticorpo primário. Se esse anticorpo é marcado, a detecção direta do antígeno é possível. Geralmente, o anticorpo secundário é marcado, logo o antígeno é detectado indiretamente.

[084]. O anticorpo secundário pode ser um anticorpo policlonal ou monoclonal que por sua vez é produzido em animais

hospedeiros como, camundongos, coelhos, cabras ou ovelhas. O anticorpo secundário é um anticorpo espécie-específica do anticorpo primário, ou seja, se o anticorpo primário é um anticorpo monoclonal de camundongo, o anticorpo secundário deve ser um anticorpo anti-camundongo produzido em outro animal hospedeiro que não camundongo. Os anticorpos secundários são disponíveis com especificidade para molécula total de anticorpo ou para fragmentos de anticorpo como regiões Fc ou Fab bem como para diferentes classes e subclasses.

[085]. As marcações usadas em anticorpos secundários podem ser isótopos radioativos, enzimas ou fluoróforos. Geralmente, marcações com enzimas ou fluoróforos são utilizadas. Enzimas fornecem um sinal detectável através da reação com um substrato específico que gera um produto colorido ou fluorescente ou liberação de luz. As enzimas mais usadas são fosfatase alcalina e peroxidase (HRP). Os fluoróforos mais utilizados para marcação são fluoresceína e rodamina.

[086]. Anticorpos secundários também podem ser marcados com biotina. A presença da biotina permite eficiente detecção com avidina ou estreptavidina marcadas com enzimas ou fluoróforos. Sistemas com biotina apresentam a característica de amplificação do sinal, aumentando assim a sensibilidade. Anticorpos secundários também podem ser conjugados com agarose ou ouro coloidal.

[087]. Proteínas ligantes de anticorpos como Proteína A, Proteína G, Proteína A/G e Proteína L também podem ser úteis na detecção de anticorpos.

[088]. A detecção e quantificação de substâncias como peptídeos, proteínas e anticorpos pode ser realizada pela técnica

de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assays*) também chamada de EIA (*Enzyme Immunoassay*). A técnica de ELISA é realizada em placas de poliestireno ou PVC de 96 ou 384 poços nas quais proteínas, peptídeos ou anticorpos são passivamente ligados. Moléculas pequenas, como peptídeos podem ser imobilizados com maior eficiência a placas através de biotinylação de peptídeos e emprego de placas revestidas com estreptavidina. O formato da técnica pode ser direto, indireto, sanduíche ou de competição. Mais comumente, a detecção da reação entre antígeno e anticorpo é feita usando marcações fluorescentes ou enzimáticas. O sinal emitido após a adição dos substratos enzimáticos pode ser colorimétrico, quimiluminescente ou fluorescente. Entre os substratos colorimétricos estão PNPP, ABST, OPD e TMB.

[089]. A técnica de ELISA também permite a detecção de citocinas como interferon gama (IFN- $\gamma$ ). O IFN- $\gamma$  é uma citocina produzida principalmente por células T em resposta a antígenos e sua detecção tem mostrado utilidade no diagnóstico da Leishmaniose (Geluk A. *et al.*, *Clin Vaccine Immunol.*, 15: 522-533, 2008). A análise de IFN- $\gamma$  é baseado no princípio que células T de indivíduos sensibilizados com antígenos de *Leishmania spp.* produzem IFN- $\gamma$  quando reencontram estes antígenos. Logo, níveis aumentados de IFN- $\gamma$  é indicativo de infecção. Na análise de IFN- $\gamma$ , sangue total (diluído ou não diluído) ou células mononucleares do sangue periférico, separadas por gradiente de densidade em Ficoll™, são cultivadas na presença de antígenos, tal como peptídeos e quando presentes, células T sensibilizadas secretam IFN- $\gamma$ . O sobrenadante da cultura de células contendo a citocina pode ser então detectado por teste de ELISA sanduíche. A quantificação de IFN- $\gamma$  também pode ser feita utilizando ELISPOT (*Enzyme-Linked Immunospot Assay*).

[090]. Portanto, além de amostras contendo anticorpos, sobrenadantes de cultura de células obtidas de indivíduos também podem ser utilizados como amostras.

[091]. Além da técnica de ELISA, outras técnicas podem ser utilizadas para a detecção de antígenos de leishmania ou anticorpos específicos para eles. Entre as técnicas estão, *Western Blotting/immunoblotting*, imunoprecipitação, aglutinação, imunofluorescência, radioimunoensaio, *Spot Synthesis*, microarranjo, *dipstick* (análise imunocromatográfica), MAPIA (*Multiantigen Print Immunoassay*).

[092]. Em *Western Blotting* ou também chamado *immunoblotting*, antígenos, tal como peptídeos, por exemplo na forma de conjugados, polímeros ou MAPs, poderiam ser transferidos a membranas, geralmente, de nitrocelulose ou fluoreto de polivinilideno após eletroforese em gel de poliacrilamida. Após bloqueio da membrana para prevenir ligações não específicas, a membrana é incubada com anticorpos de amostras de indivíduos. Anticorpos anti-*Leishmania spp.* se presentes na amostra se ligarão ao antígeno fixado na membrana e poderão ser detectados por adição de um anticorpo secundário marcado. Um substrato adequado é então adicionado para produzir um sinal detectável como um precipitado cromogênico, quimiluminescência ou fluorescência. Vários métodos podem ser utilizados para a transferência de antígenos para membranas como, difusão simples, transferência a vácuo ou eletrotransferência. Comumente, a eletrotransferência também chamada de eluição eletroforética é o método mais utilizado e pode ser realizada pelo sistema úmido ou semi-seco. Geralmente, anticorpos secundários são marcados a enzimas ou fluoróforos. O sinal obtido de substratos

quimiluminescentes pode ser detectado usando filme de raios-X ou equipamento de imagem digital.

[093]. Outras técnicas como imunodifusão e aglutinação poderiam ser empregadas para detecção de antígenos de leishmania ou anticorpos anti-leishmania. São técnicas de baixa sensibilidade, mas se apresentam como alternativas para aplicações a campo e em países menos desenvolvidos. A imunodifusão se baseia na precipitação que ocorre quando antígeno e anticorpo se difundem em ágar e o complexo antígeno-anticorpo formado se apresenta sob a forma de linha ou arco de precipitação. Enquanto, a reação de aglutinação se caracteriza pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e partículas insolúveis que contêm determinantes antigênicos em sua superfície. A aglutinação pode ocorrer com partículas inertes (partículas de látex, poliestireno, betonita, *sepharose*, etc.) ou com células antigênicas não relacionadas como hemácias as quais se adsorvem ou se fixam antígenos solúveis.

[094]. A técnica de imunofluorescência é utilizada para pesquisa de anticorpos e antígenos. Na imunofluorescência direta, um anticorpo específico marcado com fluoróforo se liga ao antígeno em células ou tecidos formando um imunocomplexo que é observado em microscópio de fluorescência. A imunofluorescência indireta, antígenos em células ou tecidos são detectados inicialmente, por incubação com anticorpo específico direcionado contra o antígeno que se quer pesquisar seguido da incubação com um anticorpo anti-anticorpo primário marcado com fluoróforos. A imunofluorescência indireta, para a pesquisa de anticorpos, antígenos fixados a lâminas de vidro são incubados com anticorpos de amostras para formação do complexo antígeno-anticorpo. Após, o anticorpo secundário marcado

com fluoróforo é adicionado a preparação e se houver anticorpo na amostra ocorrerá a formação da fluorescência. Para amplificação da reação fluoróforos podem ser conjugados a estreptadina. Sendo assim, a biotina marcada com o anticorpo secundário reage com a estreptavidina conjugada a um fluoróforo.

[095]. No radioimunoensaio reagentes, como antígeno ou anticorpo, são marcados com radioisótopos para detectar antígeno ou anticorpo não-marcado na amostra. Um antígeno (ou anticorpo) não marcado é ligado a um suporte sólido, tal como uma superfície plástica ou matrizes particuladas, e a fração do anticorpo (ou antígeno) retido na superfície é então determinada. O ensaio pode ser competitivo ou com excesso de reagente. Vários radioisótopos podem ser utilizados, entre eles os mais empregados são  $^{125}\text{I}$  e  $^{131}\text{I}$ . Além do sistema de fase sólida outros métodos como imunoprecipitação, separação química e técnicas com adsorventes podem ser utilizadas na separação das frações livre e ligada da substância marcada.

[096]. Na técnica de *Spot Synthesis*, peptídeos são sintetizados em posições definidas (*spot*) em uma membrana de celulose usando a estratégia química Fmoc/tBu. A membrana de celulose com peptídeos ligados pode ser usada para a detecção de anticorpos em amostras seguindo os mesmos passos já descritos para o *Western Blotting*.

[097]. Microarranjo de proteínas ou peptídeos é uma outra tecnologia que apresenta utilidade na detecção de anticorpos em amostras. Nessa técnica, lâminas de vidro adequadas contendo antígenos são incubadas com amostras contendo anticorpos. Anticorpos específicos ligados ao antígeno são detectados por adição do anticorpo secundário marcado com fluoróforos.

[098]. O método imunocromatografia também se mostra uma ferramenta na detecção de anticorpos em amostras. Neste teste, a amostra contendo anticorpos é depositada sobre uma tira de membrana de nitrocelulose. Anticorpos na amostra se ligam ao anticorpo de detecção marcado com esferas de látex ou ouro coloidal fixado na membrana. O complexo formado – anticorpos da amostra e anticorpo de detecção – se move até encontrar o antígeno imobilizado na membrana de nitrocelulose e se na amostra houver anticorpos específicos para o antígeno a fita mudará de cor. A análise pode ser qualitativa ou quantitativa e nesse caso o método é combinado a um sistema de detecção capaz de quantificar a reação de ligação.

[099]. MAPIA (*Multiantigen Printing Immunoassay*) é um outro método de detecção de anticorpos e se baseia na aplicação direta de antígenos por impressão sobre membranas de nitrocelulose seguido por métodos de detecção de anticorpos clássicos, tal como anticorpos conjugado a enzimas e substratos cromogênicos. MAPIA permite a detecção de anticorpos a vários antígenos em uma única análise.

[100]. Além dos métodos de detecção de anticorpos anti-leishmania em amostras, outros métodos como análise de linfoproliferação também permitem avaliar a exposição a agentes infecciosos. O teste de linfoproliferação avalia, em cultura celular, as respostas de linfócitos em contato com antígenos específicos e mitógenos (geralmente, concanavalina A ou fitohemaglutinina). Culturas de células incluem células mononucleares separadas do sangue periférico ou culturas de sangue total. A ativação da resposta imune promove a proliferação celular da cultura e essa ativação pode ser identificação pela contagem celular em microscopia, pela incorporação de material radioativo ao DNA (por exemplo, timidina

tritiada), pela redução do azul de tetrazólio (MTT), pela incorporação lisossomal de corante vermelho neutro e por citometria de fluxo.

[101]. A detecção de resposta humoral ou celular frente a antígenos, tal como proteínas e peptídeos, pode ser realizada por diferentes métodos que foram aqui acima apresentados, porém não são limitados a esses.

[102]. A presente invenção também faz vistas ao desenvolvimento de *kit* de diagnóstico para leishmaniose. O *kit* pode incluir qualquer configuração e composição para realizar os vários métodos de análise descritos aqui. O *kit* será apresentado em uma forma comercialmente acondicionada contendo os elementos essenciais requeridos para conduzir uma análise de acordo com os métodos expostos. Portanto, o *kit* compreende um ou mais peptídeos (isolado ou combinados/formas variantes), dispositivos, reagentes e instruções escritas para a realização do ensaio.

[103]. Por exemplo, um *kit* para detectar a presença de anticorpos anti-*Leishmania*. pode conter um ou mais peptídeos para imobilização ou já imobilizados em um suporte sólido e reagentes de detecção da ligação entre anticorpos da amostra e peptídeos como anticorpo anti-IgG humana conjugado a biotina e estreptavidina conjugada à peroxidase. Ou, outro *kit* poderia constituir de um dispositivo constituído de tiras imunocromatográfica impregnadas com peptídeos e anticorpo de detecção e podendo ainda conter pipetas capilar e solução tampão.

[104]. Os exemplos abaixo demonstram que peptídeos são capazes de induzir a produção de anticorpos e, além disso, esses anticorpos anti-peptídeos são reconhecidos por antígenos naturais de *Leishmania braziliensis*, ainda que tais peptídeos possam ser utilizados para quaisquer espécies de *Leishmania*. Além de incitar uma

resposta humoral, os peptídeos apresentam potencialidade em induzir uma resposta celular como mostrado no exemplo de estudo de hipersensibilidade do tipo tardio.

[105]. A reação de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) permite avaliar a exposição prévia do indivíduo ao antígeno bem como avaliar a resposta imune celular de indivíduos frente a um antígeno. Testes de DTH empregando reagentes específicos são extremamente desejados devido a sua simplicidade de execução e leitura permitindo, desde modo, sua aplicação a campo. O teste de DTH consiste na aplicação intradérmica do antígeno, geralmente, na face anterior do antebraço e após 48-72 h faz-se a leitura do tamanho da induração. A quantidade de antígeno aplicada irá depender principalmente da constituição da composição e deverá ser determinada após extensa experimentação.

[106]. Composições imunológicas para uso em testes de DTH compreendem um ou mais peptídeos (isolado ou combinados/formas variantes) associado a um ou mais veículos fisiologicamente aceitáveis. Um exemplo de veículos fisiologicamente aceitáveis constitui solução salina acrescida de agentes preservantes como fenol.

[107]. Uma vez que peptídeos são capazes de induzir uma resposta humoral e/ou resposta celular, a presente invenção inclui composições imunológicas para uso como vacinas, desde que, vacinas são designadas para aumentar a imunidade e prevenir a infecção em indivíduos.

[108]. Composições imunológicas para uso como vacinas compreendem um ou mais peptídeos (isolados ou combinados/formas variantes), preservativos, veículos fisiologicamente aceitáveis e agentes adicionais como adjuvantes, que podem estimular

a resposta imune do indivíduo ao componente imunogênico. Entre exemplos de adjuvantes, encontram-se, adjuvante de Freund completo ou incompleto, hidróxido de alumínio, lipossomas, complexos imunoestimulantes (ISCOMS), etc. A composição da formulação bem como via de imunização e o número de doses a ser administrado para induzir uma efetiva resposta humoral e/ou celular deverão ser determinados experimentalmente.

### **Exemplo 1: Biosselação de Bibliotecas Apresentadas em Fagos**

#### Pacientes e controles

[109]. Foram coletadas amostras de sangue de pacientes portadores de LTA para a obtenção de soros, seleção das imunoglobulinas específicas contra *L. braziliensis* e para avaliação dos antígenos produzidos no presente trabalho. Os voluntários foram provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e de várias Regionais de Saúde do Estado do Paraná. Foram também coletadas amostras de sangue de indivíduos saudáveis que não apresentaram histórico de leishmaniose ou doença de chagas, moravam em zona indene (livre da doença) e não mantinham contato com pacientes infectados com essas doenças. Os soros foram coletados e armazenados em freezer a -20°C.

#### Produção de Antígenos de *Leishmania braziliensis* e de *L. amazonensis*

[110]. Para realização dos testes ELISA e *Western blotting* foram produzidos antígenos a partir de culturas de promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/94/Cur22) e de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269). As cepas utilizadas foram previamente caracterizadas por isoenzimas e encontram-se armazenadas no criobanco do Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR.

[111]. Os promastigostas foram cultivados em meio bifásico Novy-McNeal-Nicolle (NNN), com a fase líquida sendo solução salina fisiológica 0,9% esterilizada e apirogênica a 24°C. As cepas foram repicadas entre cinco a sete dias para novos tubos contendo meio de cultura. Após a obtenção de seis tubos, ricos em formas promastigotas, 0,5 mL do sobrenadante de cada tubo foi repassado para garrafas de cultura (100 mL) estéreis contendo o meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) enriquecido com soro fetal bovino (Gibco, Rockville, Maryland, USA) a 10%. Após a multiplicação dos parasitos, as formas promastigotas foram recuperadas por filtração em gaze esterilizada. O conteúdo obtido foi submetido a centrifugação a 3.500 g por 10 minutos a 4°C. Foram realizadas lavagens com solução fisiológica 0,9%, 0,3%, 0,9% e PBS (tampão fosfato-salino) pH 7,2, respectivamente, para a eliminação do meio de cultura restante, lise das hemácias e remoção da hemoglobina do coelho. A recuperação das células foi feita por centrifugações a 3.500 g por 10 minutos a 4°C.

[112]. Após a última centrifugação foi realizado o rompimento dos parasitos ressuspendendo-se o sedimento com água destilada esterilizada num volume igual à metade do volume desse sedimento. Para a lise completa dos protozoários também foram realizados seis ciclos de congelamentos e descongelamentos súbitos imergindo os tubos em nitrogênio líquido até seu congelamento e imediato descongelamento em banho-maria a 37°C. Mantendo os antígenos conservados em banho de gelo foi aplicada a ação do Ultra-Som Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Berlim, Alemanha) a 150 W por seis séries de 30 segundos com intervalos de um minuto.

[113]. O produto resultante foi centrifugado por 30 minutos em ultra-centrífuga a 4°C e 14.000 g. Os sobrenadantes foram recuperados e filtrados em sistema esterilizante (membrana 0,22 µm), o

que constituiu o antígeno solúvel (AS) de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis*. Em seguida foi realizada dosagem de proteínas dos ASs pelo método de Lowry (LOWRY, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265-275, nov. 1951; SZARGIKI, R. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 13, n. 1, p. 47-52, feb. 2009).

[114]. Foram feitas aliquotas dos conteúdos antigênicos produzidos que foram armazenadas em tubos criogênicos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso nos experimentos posteriores.

[115]. Após a realização da dosagem de proteínas obteve-se 5,19 mg/mL para *L. braziliensis* e 1,58 mg/mL para *L. amazonensis*. As proteínas foram aliquotadas e armazenadas para todos os experimentos subsequentes.

#### Avaliação do Perfil eletroforético dos antígenos solúveis de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*

[116]. Para análise do perfil eletroforético do AS de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis* produzidos foi realizada a técnica de Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. v. 227, p. 680-685, aug. 1970). Para isso, 20  $\mu\text{g}$  de cada fração dos antígenos do parasito foram diluídos em tampão de amostra 4X, em presença do agente redutor beta-mercaptoetanol e aquecida a  $100^{\circ}\text{C}$  por cinco minutos. Essa mistura foi distribuída em canaletas de um gel de poliacrilamida a 15%. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V em tampão Tris 0,025M, glicina 0,2M e SDS 0,5%, pH 8,3.

[117]. Terminada a corrida foi realizada a coloração do gel por nitrato de prata. Para isso, o gel foi lavado com água destilada por cinco minutos, fixado com metanol 50% por 20 minutos e lavado por mais 10 minutos com água destilada. Posteriormente, o gel foi fixado com glutaraldeído 10% por 30 minutos, e lavado com água por quatro vezes por 10 minutos. Para corar as proteínas, uma solução de nitrato de prata 1% foi preparada, adicionando-se 53% de hidróxido de sódio a 0,36% e 3,5% de hidróxido de amônio. O gel foi corado por 20 minutos ao abrigo de luz e lavado duas vezes com água destilada por cinco minutos. Para revelação, o gel foi incubado com solução contendo 0,25% de ácido acético e 0,1% de formaldeído. Para parar a reação foi adicionada uma solução de parada contendo ácido acético 1% por 20 minutos.

[118]. O perfil eletroforético dos antígenos solúveis de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis* foi obtido em gel de poliacrilamida 15% em condições redutoras (FIGURA 1). Ambos os extratos antigênicos apresentaram massas proteicas entre 15 e 100 KDa. Na coluna 2 pode-se observar aproximadamente 12 bandas presentes nos antígenos de *L. braziliensis* enquanto que na coluna 3 observa-se um total aproximado de 11 proteínas para o antígeno de *L. amazonensis*. Este resultado demonstra o compartilhamento de proteínas entre as duas espécies estudadas.

[119]. Esta etapa foi importante para confirmação da extração das proteínas a serem utilizadas no presente estudo, bem como para a avaliação da similaridade de proteínas totais das duas espécies de *Leishmania* disponíveis.

#### Seleção de imunoglobulinas anti-*L. braziliensis*

[120]. Os soros dos pacientes com LTA e dos indivíduos não portadores de LTA foram testados pelo método ELISA indireto para

pesquisa de anticorpos contra-Leishmania. Para a padronização deste ensaio foram utilizadas placas de 96 poços (Costar, Cambridge, Massachusetts, USA), anti-imunoglobulina G humana Fc específica conjugada a peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) e o cromógeno OPD (Ortofenilenodiamina - Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

[121]. Foram analisadas quatro concentrações dos antígenos de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis* (125, 250, 500 e 1.000 ng/poço), frente a três diluições (1:25, 1:50 e 1:100) dos soros (controles positivos e negativos e amostras teste) e três diluições do conjugado (1:5000, 1:7500 e 1:10.000). Em todos os testes ELISA, realizados durante este trabalho, os soros foram avaliados em duplicatas e os resultados apresentados representam a média de cada amostra. As diluições do conjugado, do soro e dos antígenos capazes de melhor discriminar entre controles positivos e negativos foram selecionadas. Os testes passaram a ter a seguinte padronização: antígenos 500 ng por poço, soro diluído 1:100 e conjugado diluído 1:10.000.

[122]. Para a avaliação de todos os soros dos pacientes e seleção das imunoglobulinas o teste foi realizado fazendo-se a sensibilização das placas com 100 µL do antígeno produzido (500 ng) em coating buffer (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,16%, NaHCO<sub>3</sub> 0,29%, pH 9,6) por poço e incubação *overnight* a 4°C. Após esta etapa, a solução de antígeno foi descartada e as placas lavadas, duas vezes, com solução de lavagem (NaCl 0,9% - Tween 20 0,05%) para remoção do antígeno não fixado. O bloqueio dos espaços dos poços não ocupados pelo antígeno foi realizado, por uma hora a 37°C, adicionando-se 120 µL de solução de bloqueio (caseína 2% em PBS pH 7,4) por poço. Após incubação, nova lavagem da placa foi realizada. Os soros diluídos (1:100) em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7,4 - Tween 20

0,05%) foram adicionados à placa e incubados em estufa a 37°C por uma hora. As placas foram novamente lavadas, por quatro vezes, foram adicionados 100 µL por poço do conjugado anti-humano diluído 1:10000 em tampão de incubação e as placas incubadas por uma hora a 37°C. Foram realizadas quatro lavagens das placas e o substrato, composto por uma pastilha de OPD (2 mg) diluída em 10 mL de tampão citrato 0,15M, pH 5,0 e 2 µL de peróxido de hidrogênio a 30% foram aplicados. Após 15 minutos, ao abrigo de luz, foi efetuada a parada da reação adicionando-se 20 µL da solução de ácido sulfúrico 1:20. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (leitor de microplaca) no comprimento de onda de 492 nm.

[123]. Para determinação do nível de corte (*Cut-off*) do teste, as 37 amostras de soro humano provenientes de zona indene para leishmaniose no Estado do Paraná foram analisadas contra o AS. A média obtida das absorbâncias dessas 37 amostras foi somada a duas vezes o desvio padrão obtido para cálculo do *Cut-off*.

#### Precipitação das imunoglobulinas anti-*Leishmania* com sulfato de amônio

[124]. Foi realizada a seleção de imunoglobulinas totais para posterior purificação de IgGs contra - *L. braziliensis*. Para isso, foram utilizados os soros de pacientes (positivos no teste ELISA indireto descrito no item 2.6) que compuseram um pool de soros humanos. Esse conteúdo foi centrifugado por 30 minutos a 3.000 g a 4°C. Em banho de gelo e sob agitação, o sobrenadante obtido teve suas imunoglobulinas precipitadas por adição lenta de igual volume de solução de sulfato de amônio saturada (HARLOW, E.; LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 726, 1988). A mistura foi deixada em repouso a 4°C *overnight* e posteriormente foi transferida para tubos de 50 mL e centrifugada por 30 minutos a 3.000 g

a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as imunoglobulinas presentes no precipitado foram reconstituídas em PBS pH 7,4. O conteúdo foi adicionado a membranas de dializadoras e dialisado contra PBS, pH 7,4, para remoção do sulfato de amônio.

[125]. A pureza e a massa molecular das imunoglobulinas foram avaliadas por SDS-Page.

#### Obtenção de imunoglobulinas da sub-classe G (IgG)

[126]. Para posterior realização dos ciclos de seleção (*pannings*) da técnica de *Phage display*, a purificação de IgGs anti - *L. braziliensis* dos pacientes com LTA ocorreu em duas etapas. Inicialmente, as IgGs foram purificadas por cromatografia de afinidade em proteína G-agarose, seguida da purificação das imunoglobulinas a partir de antígenos transferidos para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF - Millipore Corporation, Billerica, Maryland, USA).

[127]. As imunoglobulinas da classe G foram obtidas por cromatografia de afinidade em proteína G - agarose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) com o objetivo de que a porção Fc das IgGs reconhecesse a molécula da proteína G fixada na resina e assim fosse possível recuperar este tipo específico de anticorpo.

[128]. A ligação entre o antígeno (Proteína G - agarose) e os anticorpos (imunoglobulinas G) foi realizada aplicando-se uma fração das imunoglobulinas totais à coluna de proteína G - agarose, que permaneceu sob agitação por uma hora a temperatura ambiente. A coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 até não se detectar mais proteínas pelo teste de Bradford (BRADFORD, M. M. a rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976). As IgGs foram eluídas por mudança de pH com tampão glicina 100 mM, NaCl 150 mM,

pH 2,7, recolhidas e neutralizadas com tampão Tris-HCl, 1 M, pH 9,0. Em seguida, a coluna foi reequilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. As frações contendo as imunoglobulinas G obtidas foram reunidas numa só amostra, dialisadas contra PBS 7,4 (para remoção o excesso de sais que poderiam atrapalhar as etapas posteriores de caracterização de proteínas) e concentradas usando o dispositivo Amicon Ultra-15 10 kDa (Millipore Corporation, Billerica, Maryland, USA). A pureza e a massa molecular da solução de imunoglobulinas foram avaliadas por SDS-PAGE.

#### Obtenção de imunoglobulinas G específicas para *L. braziliensis*

[129]. Para obtenção de imunoglobulinas G anti-*L. braziliensis*, dois miligramas de antígenos de *L. braziliensis* foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de PVDF em tampão composto de 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol *overnight* a 24 V, seguidos de uma hora a 48 V. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 0,3% de Tween 20 em PBS pH 7,4 por uma hora, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS Tween 20 0,05% (PBST-0,05%) por três vezes de cinco minutos e incubada com 3 mg de IgGs diluídas em PBST-0,05%. Após a incubação de duas horas a membrana foi lavada com PBST-0,05%, por cinco vezes de cinco minutos e os anticorpos foram eluídos por adição de tampão glicina 0,1 M, NaCl 0,15M, pH 2,7 sob agitação por 30 minutos. A solução de anticorpos eluídos foi recuperada e imediatamente neutralizada com Tris-HCl, 1 M, pH 9,0. Os anticorpos obtidos foram concentrados usando o dispositivo Amicon Ultra 15 10kDa (Millipore Corporation, Billerica, Maryland, USA) e a dosagem de protéica foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, M. M. a rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976).

[130]. Para avaliar a purificação e a reatividade das imunoglobulinas anti-*L. braziliensis* foram realizadas as técnicas ELISA e *Western blotting*. Para o *Western blotting*, foi realizada primeiramente a técnica SDS-PAGE com antígenos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (40 µg de antígenos por canaleta) e posteriormente foi realizada a eletrotransferência do gel contendo os antígenos para membrana de PVDF (Millipore Corporation, Billerica, Maryland, USA). A transferência se deu sob a uma corrente de 24 V *overnight* e 48 V por uma hora em tampão de transferência com pH 8,3 composto por de 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol.

[131]. Terminada estas etapas a membrana foi bloqueada com 0,3% de Tween 20 em PBS pH 7,4 por uma hora sob agitação, a fim de se evitar interações inespecíficas. A membrana foi então lavada, por quatro vezes, de cinco minutos cada com 0,05% de Tween 20 em PBS pH 7,4 e a seguir foi incubada por duas horas, sob agitação com as imunoglobulinas específicas anti-*L. braziliensis* (40 µg/mL em PBS pH 7,4). Após a incubação, a membrana foi lavada quatro vezes de cinco minutos cada. Posteriormente foi incubada por uma hora, a temperatura ambiente, sob agitação com o anticorpo anti IgG humano Fc específico conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) na diluição 1:5.000 por uma hora. Finalmente, após nova lavagem, foi realizada a revelação com uma solução de 1 mg DAB (Tetrahydrocloroeto 3,3'-Diaminobenzidina) em 1,5 mL de 50 mM Tris, 0,15 M, NaCl pH 7,6 e 1,2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% por tira (cada tira foi incubada com 1,5 mL). A solução de revelação foi mantida até o aparecimento das bandas e a reação foi parada por lavagem das tiras com PBS pH 7,4.

[132]. Dos 198 soros de pacientes analisados pelo teste ELISA, 57 soros foram considerados positivos para LTA, pois apresentaram absorvância superior a 0,139 (valor do *Cut-off* estabelecido). Das amostras de soro destes pacientes foi formado um pool de  $\pm$  50 mL para precipitação das imunoglobulinas. A eletroforese em SDS-PAGE, sob condições redutoras e não redutoras, demonstra a presença da banda referente à albumina presente nas IgGs totais do soro humano precipitadas por sulfato de amônio (coluna dois). A albumina possui peso molecular de aproximadamente 60 kDa e na coluna três observa-se a retirada dessa molécula representando o êxito da etapa de cromatografia de afinidade para obtenção de imunoglobulinas da subclasse G (FIGURA 2).

[133]. As imunoglobulinas G, obtidas após cromatografia de afinidade, foram avaliadas quanto sua reatividade frente a antígenos de *Leishmania sp.* por *Western Blotting* (FIGURA 3). Observou-se a reatividade frente a soro de paciente sabidamente positivo (colunas dois e quatro) e contra IgGs purificadas por cromatografia de afinidade (colunas três e cinco).

[134]. Bandas reativas foram visualizadas tanto com IgG total como na presença das IgGs purificadas. Nota-se que existe reação cruzada entre as diferentes espécies de *Leishmania* analisadas. Um exemplo pode ser constatado na reatividade entre as bandas de 10 e 15 kDa e de 20 kDa e 50 kDa.

[135]. A reatividade das IgGs específicas obtidas anti-*L. braziliensis* foi avaliada por ELISA (FIGURA 4). O ensaio demonstra que as imunoglobulinas específicas mesmo em menores concentrações apresentam testes com absorvâncias maiores daquelas encontradas no teste com imunoglobulinas totais. Assim, conclui-se que o método de purificação permitiu a concentração de anticorpos antígeno-

específicos a serem empregados na técnica de *Phage display*. A purificação das imunoglobulinas específicas de *L. braziliensis*, ocorreu com sucesso, pois, tomando-se como exemplo o primeiro par de barras do gráfico, observa-se que as IgGs específicas para *L. braziliensis*, em uma concentração 10 vezes menor que a da IgG total, apresentaram maior absorvância (FIGURA 4).

#### Expressão dos peptídeos na superfície de fagos (*Phage Display*)

[136]. Após a obtenção dos anticorpos IgG anti-*L. braziliensis* a partir do soro de pacientes, foi realizada a técnica de *Phage display* como descrito por Villard et al. (2003), com modificações descritas abaixo.

[137]. Inicialmente, dois imunotubos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram revestidos com 10 µg de proteína G (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) diluída em TBS (solução salina tamponada com Tris - 50 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH 7,5) e foram incubados, sob agitação, a 4°C, *overnight*. Posteriormente, os imunotubos foram lavados duas vezes com tampão de lavagem (TBS-T 0,05%), bloqueados com 3% BSA em TBS-T 0,05% por duas horas a 37 °C e lavados novamente. Os dois imunotubos tiveram etapas distintas na técnica de *Phage display*. No tubo um, foram adicionados 5x 10<sup>12</sup> fagos de quatro diferentes bibliotecas de peptídeos (LX4, LX8, X8CX8, X15) obtidas de J. Scott (Simon Fraser University, Canadá), que permaneceram incubadas *overnight* a 4°C. Já no imunotubo dois, 5 µg de IgGs específicas diluídas em 1,5 mL de TBS foram adicionadas onde permaneceram *overnight* a 4°C. Após o período de incubação, o sobrenadante do imunotubo dois foi desprezado e o sobrenadante do imunotubo um (contendo fagos que não se ligam a proteína G) foi adicionado ao imunotubo dois onde permaneceu, sob incubação, *overnight* a 4°C. Foram realizados quatro pannings sendo que, no primeiro, utilizou-se 5 µg/mL do anticorpo

específico anti-*L. braziliensis*, e para o segundo, terceiro e quarto panning, 2,5 µg/mL, 1 µg/mL e 1 µg/mL respectivamente.

[138]. O imunotubo que permaneceu no desenvolvimento desta metodologia (tubo dois) teve seu sobrenadante descartado e então foi lavado 10 vezes com TBST-0,5% e cinco vezes com TBS-T 0,05% para a retirada dos fagos não ligados. Posteriormente, os fagos cujos peptídeos foram reconhecidos pelos anticorpos de pacientes, foram eluídos durante 30 minutos por modificação de pH da solução com auxílio do tampão glicina, 0,1 mol/L, pH 2,2, BSA 1 mg/mL. O eluato foi transferido para um microtubo e neutralizado imediatamente com tampão Tris-HCl, 2 mol/L, pH 9,0.

[139]. Para amplificação dos fagos, à 10 mL da solução de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*), cepa K91 (densidade ótica a 550 nm = 1,9) preparadas previamente em meio Luria Bertani (LB), adicionaram-se 1,5 mL do eluato contendo os fagos. O conteúdo foi incubado por 10 minutos a 37°C sem agitação e posteriormente, adicionadas a 100 mL de meio LB pré-aquecido a 37°C contendo 0,2 µg/mL de tetraciclina (o gene de resistência a tetraciclina presente no genoma do fago é o que possibilita o crescimento e seleção de bactérias infectadas com fagos). Após 30 minutos de indução em agitação a 225 rpm, ajustou-se a concentração de tetraciclina para 20 µg/mL. O crescimento bacteriano ocorreu *overnight* a 37°C e sob agitação de 225 rpm.

[140]. Os fagos amplificados foram purificados com precipitação em polietilenoglicol 8000 (PEG 8.000) 20%, NaCl 2,5 M. Para isso, a cultura de bactérias foi primeiramente colocada em tubos de 250 mL e centrifugada a 4°C, a 5.000 g durante 20 minutos. O pélete formado (composto principalmente por bactérias), foi ressuspenso em meio LB e estocado em freezer -80°C com de 15% de glicerol. O

sobrenadante contendo os fagos foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 15% de PEG 8.000 20%, NaCl 2,5 M. O conteúdo foi misturado por inversão e precipitado overnight em gelo a 4°C. A solução foi centrifugada a 4°C, a 12.000 g por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em tampão TBS. Posteriormente, a solução foi transferida para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 14.500 g por 15 minutos a 4°C para remoção de possíveis restos celulares. Os fagos obtidos foram empregados em um próximo ciclo de seleção ou armazenados a -20°C.

[141]. Titulou-se o pool de fagos adicionando-se 10 µL de cada uma das diluições dos fagos 10-1, 10-2 e 10-4 para a titulação parcial e 10-6, 10-8 e 10-10 para a titulação final), em 200 µL de bactérias *E. coli* K91 previamente cultivadas. Entende-se para titulação parcial, o título dos fagos eluídos e não amplificados e titulação total, o título dos fagos após amplificação. Os microtubos foram incubados por 15 minutos a 37°C sem agitação e por mais 15 minutos a 37°C sob agitação de 225 rpm.

[142]. As células foram plaqueadas em ágar LB contendo 20 µg/mL de tetraciclina, para posterior contagem das colônias. As placas foram incubadas overnight em estufa a 37°C. O título foi determinado multiplicando o número de colônias pelo fator de diluição da placa e por 100 para obter-se o número de fagos por mL.

### **Exemplo 2: Reatividade dos fagos**

[143]. Após o quarto ciclo de seleção, a reatividade dos fagos dos pannings reconhecidos pelos anticorpos de pacientes foi avaliada por teste de ELISA.

[144]. Uma placa de 96 poços (Costar, Cambridge, Massachusetts, USA) foi sensibilizada com 0,5 µg/mL de anticorpos comerciais anti-fago (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) em

coating buffer (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6), *overnight* a 4°C. As cavidades foram lavadas por duas vezes com NaCl 0,9% Tween 20 - 0,05%. O bloqueio dos sítios livres foi feito utilizando-se uma solução de caseína 2% em PBS pH 7,4 durante 1 hora a 37°C. A cada poço, foram adicionados 10<sup>9</sup> fagos eluídos de cada ciclo de seleção juntamente com tampão de incubação. A placa foi incubada por uma hora a 37°C. Após, as cavidades foram lavadas quatro vezes e incubadas a 37°C durante uma hora com o IgGs anti-*L. braziliensis* (10 µg/poço), e posteriormente, com o anticorpo anti IgG humana porção Fc específica conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) diluído 1:10.000. As cavidades foram lavadas novamente por quatro vezes. Para revelação da reação foi adicionado o substrato, composto por uma pastilha de 2 mg de OPD diluídas em 10 mL de tampão citrato pH 5,0 e 2 µL de peróxido de hidrogênio a 30%. Após 15 minutos, ao abrigo de luz, foi efetuada a parada da reação adicionando-se 20 µL da solução de ácido sulfúrico 1:20 em toda a placa. A leitura foi realizada levando-se placa imediatamente ao leitor de microplaca em comprimento de onda de 492 nm.

[145]. Para a identificação de clones de fagos com capacidade de ligação a anticorpos de pacientes com leishmaniose o *panning* mais imunorreativo foi escolhido. Colônias isoladas foram obtidas após o cultivo em ágar LB em placas de Petri 140 x 15mm. Depois do crescimento, cada colônia bacteriana isolada foi pinçada com palitos esterilizados e transferida para uma cavidade de placa de cultura de 96 poços fundo em U contendo 200 µL de meio LB e 20 µg/mL de tetraciclina. Após cultivo *overnight* em *shaker* com rotação de 225 rpm a 37°C, a placa foi centrifugada a 1.600 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante da placa de cultura contendo os fagos foi usado diretamente para realização do teste ELISA.

[146]. Cada fago foi testado por teste ELISA com soro de pacientes. Foi usado soro de pacientes diluído 1:100. Os clones foram selecionados com pool de soros de alta absorvência (acima de 0,5) em teste ELISA com AS de *L. braziliensis*. Os fagos foram testados também com pool de soros com absorvências de 0,2 e 0,3.

[147]. Na avaliação da reatividade de cada um dos quatro *pannings* por ELISA foi possível observar aumento progressivo da intensidade de reação indo do primeiro para o quarto ciclo de seleção (FIGURA 5). O número de fagos eluídos foi sempre menor que a quantidade incubada, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos imobilizados no tubo ficaram ligados a estes pela interação específica destas moléculas (TABELA 2). Pode-se observar aumento de fagos de saída a cada ciclo de seleção demonstrando o enriquecimento de fagos específicos. Esses resultados indicam que ocorreu a seleção de fagos reativos com anticorpos anti-*Leishmania*.

TABELA 2 - FAGOS DE ENTRADA E SAÍDA OBTIDOS DA BIOSSELEÇÃO POR PHAGE DISPLAY COM ANTICORPOS ANTÍGENO-ESPECÍFICOS

Ciclos de seleção	Fagos de entrada (UFC)	Fagos de saída (UFC)	% de fagos ligados (x 10 <sup>-2</sup> )	Enriquecimento
1	2,9. 10 <sup>11</sup>	3,6.10 <sup>5</sup>	0,012	
2	2,0. 10 <sup>11</sup>	3,8.10 <sup>7</sup>	1,900	153,2 X
3	2,0. 10 <sup>11</sup>	6,6.10 <sup>7</sup>	3,300	266,1 X
4	2,0. 10 <sup>11</sup>	9,8.10 <sup>7</sup>	4,900	395,2 X

#### Seleção dos clones

[148]. Foi escolhido o quarto ciclo de seleção para infectar uma cultura de *E. coli* e obter-se colônias isoladas em placa contendo meio LB. Cada clone foi testado por ELISA usando o sobrenadante da cultura e soro de pacientes com alta absorvência (acima de 0,5). Desta forma, 428 clones foram testados. Desses, 36 foram reativos frente a soros de pacientes portadores de LTA. Os fagos foram testados também com pool de soros com absorvências de 0,2 e 0,3 no teste ELISA com o AS, porém os resultados não possibilitaram a

diferenciação dos testes positivos e negativos e por isso os estudos com estes soros foram interrompidos.

### **Exemplo 3: Obtenção dos peptídicas**

#### Obtenção das sequências de aminoácidos

[149]. Os clones de fagos mais reativos (absorbância acima de 0,3) foram selecionados para sequenciamento do DNA e posterior identificação da sequência de aminoácidos inserida nos fagos. Para isso, os clones de fagos positivos amplificados em *E. coli*, foram submetidos à extração do DNA usando o kit QIAprep spin M13 (Qiagen, Hilden, Alemanha), realizada conforme instruções do fabricante. A concentração dos ácidos nucléicos foi dosada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific - Wilmington, Delaware, USA), os DNAs foram aliqüotados e armazenados a -20°C até seu uso. As reações de sequenciamento foram realizadas com o Kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, USA). Para cada reação foi usado 50 ng de DNA em volume final de 10 µL, contendo 1 µL de Big Dye Terminator v3.1 Ready Reaction MIX, 1 µL de tampão de sequenciamento 5X e 1,6 pmol do primer reverse (5'- TCG GCA AGC TCT TTT AGC – 3'). As condições do sequenciamento foram: um minuto à 96°C para desnaturação inicial do DNA seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por cinco segundos e extensão a 60°C por quatro minutos. Para purificação do DNA foi adicionado isopropanol aos microtubos para uma concentração final de 60%. Após homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 20 minutos, os tubos foram centrifugados a 15.000 g por 25 minutos. O isopropanol foi removido por inversão em papel absorvente e aos tubos foi adicionado etanol 70%. Após centrifugação a 15.000 g por 10 minutos, o etanol foi removido, os tubos foram colocados em estufa a 37°C para secagem do pélete de DNA e armazenados a -20°C.

[150]. A análise das sequências de DNA provenientes do sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied biosystems, Foster City, California, USA) foi realizada em software do próprio equipamento.

[151]. Após a identificação do DNA viral, foi usado o programa *Proteomics Tools* disponível em <http://www.expasy.ch> (opção Tools – DNA-Proteins – Translate, leitura de tradução de proteína 3'→5', utilizando-se a primeira janela de leitura - *frame 1*) para obtenção de sequência de aminoácidos codificada pelo segmento de DNA inserido no fago, bem como para obter o peso estimado de cada peptídeo. As sequências dos peptídeos obtidas foram analisadas quanto à sua similaridade com outras sequências já registradas no GenBank.

[152]. Três sequências peptídicas diferentes foram obtidas e estão apresentadas na TABELA 3. As sequências foram comparadas com outras depositadas no GenBank para verificar homologia com proteínas de *Leishmania spp.* Observou-se que os peptídeos 1, 2 e 3 alinhavam-se com proteínas de *Leishmania sp.* conforme demonstrado nas TABELAS 4, 5 e 6.

TABELA 3 - SEQUÊNCIA DE PEPTÍDEOS OBTIDAS APÓS A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY PARTINDO DE IMUNOGLOBULINAS G ESPECÍFICAS PARA *Leishmania sp.*

	Sequências	Massa esperada*	Massa obtida*	Nº de aa
Peptídeo 1	G H R M P P T S V S A L A R P	1931,031 Da	1931,059 Da	15
Peptídeo 2	T M V P K E P N P L S G L R K	2021,124 Da	2021,203 Da	15
Peptídeo 3	S K P Q P N N F K L N S L G S	1985,048 Da	1985,121 Da	15

TABELA 4 - ALINHAMENTO DAS REGIÕES DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DO PEPTÍDEO 1 COM AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO PARASITO DISPONÍVEIS NO GenBank

Proteína	Acesso	Similaridade
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania donovani</i>	XP_003859913.1	80%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania donovani</i>	XP_003859429.1	73%
GP63, leishmanolisina de <i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	XP_001562817.1	73%
GP63, leishmanolisina de <i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	XP_001562936.1	60%
Glicoproteína principal de superfície de <i>Leishmania guyanensis</i>	AAA29243.1	60%

TABELA 5 - ALINHAMENTO DAS REGIÕES DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DO PEPTÍDEO 2 COM AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO PARASITO DISPONÍVEIS NO GenBank

<b>Proteína</b>	<b>Acesso</b>	<b>Similaridade</b>
Proteína hipotética conservada de <i>L. braziliensis</i> - MHOM/BR/75/M2904	XP_001566726.1	100%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania infantum</i>	XP_001463525.2	100%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania mexicana</i> - MHOM/GT/2001/U1103	XP_003874953.1	86%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania major</i> - cepa Friedlin	XP_001681937.1	67%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania donovani</i>	XP_003859467.1	60%

TABELA 6 - ALINHAMENTO DAS REGIÕES DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DO PEPTÍDEO 3 COM AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO PARASITO DISPONÍVEIS NO GenBank

<b>Proteína</b>	<b>Acesso</b>	<b>Similaridade</b>
Subunidade alfa do coatômero pontual - <i>Leishmania major</i> cepa Friedlin	XP_001686538.1	100%
Quinase 1 de alvo pontual de rapamicina - <i>L. braziliensis</i> - MHOM/BR/75/M2904	XP_001569274.2	100%
Proteína hipotética conservada de - <i>L. braziliensis</i> - MHOM/BR/75/M2904	XP_001562100	100%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania mexicana</i> -MHOM/GT/2001/U1103	XP_003877650.1	88%
Proteína hipotética conservada de <i>Leishmania mexicana</i> -MHOM/GT/2001/U103	XP_003875078.1	62%

### Síntese dos peptídeos

[153]. Uma vez selecionados, os peptídeos foram sintetizados quimicamente pela estratégia Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonila), utilizando-se, para tal, um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina como suporte sólido insolúvel), que usa aminoácidos especiais para a síntese *in vitro*. Esses aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc e são acoplados à resina. O protocolo foi realizado conforme descrito em MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, v.32, p. 221-96, 1965 e usando o sintetizador de peptídeos automático

MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments, Nattermannallee, Alemanha).

[154]. Esta técnica consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Estes aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc, sua cadeia lateral também está protegida por um grupo protetor para evitar reações indesejadas.

[155]. Ciclos de acoplamento (de aminoácidos com seus ativadores) e desproteção (remoção do grupamento Fmoc pela presença de piperidina 20%) são realizados até que todos os aminoácidos do peptídeo a ser sintetizado estejam acoplados. Após o término do último ciclo, o peptídeo já sem o grupamento Fmoc do último aminoácido é removido da resina por uma etapa chamada de clivagem. Nesta etapa também se elimina os grupamentos protetores da cadeia lateral. Em seguida esta solução é filtrada e precipitada com éter etílico gelado obtendo-se assim o peptídeo. Após centrifugação o éter é eliminado por evaporação. Os peptídeos foram liofilizados, pesados, dissolvidos em água mili-Q e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  na concentração de 1 mg/mL.

[156]. A identidade dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massa em espectrômetro Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e software FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A técnica foi realizada no Centro de Biologia Molecular e Estrutural – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

#### Conjugação de peptídeos a proteína carreadora

[157]. Na etapa de imunização de animais, para que os peptídeos deixassem de ser haptenos foi necessário o acoplamento destas moléculas com a proteína KLH (hemocianina do molusco

Keyhole limpet) com kit específico (Pierce, Rockford, Illinois, USA) para esta finalidade.

[158]. A proteína KLH é isolada da hemolinfa de um molusco e devido ao seu alto peso molecular trata-se de um importante imunógeno. Também por tratar-se de uma proteína de molusco apresenta uma distância filogenética grande dos mamíferos, fato este que favorece a imunogenicidade desta molécula. O grande número de resíduos de lisina disponíveis faz do KLH uma das principais moléculas de acoplamento a peptídeos (HERMANSON, G.T. Bioconjugate techniques. USA:Academic, 785p., 1996).

[159]. A proteína carreadora ativada foi reconstituída em água ultrapura e dois miligramas dos peptídeos foram pesados e dissolvidos em tampão de conjugação contendo DMF (N,N-Dimethylmethanamide). Uma alíquota do peptídeo foi separada para cálculo dos grupos sulfidril livres com reagente de Ellmann. O peptídeo e a proteína ativada foram misturados e incubados sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente o conteúdo foi centrifugado a 2000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi recuperado e submetido a coluna de filtração para remoção de EDTA e azida sódica. A dosagem de proteína foi realizada usando o kit Micro BCATM Protein Assay (Pierce, Rockford, Illinois, USA).

#### Produção de anticorpos anti-peptídeos

[160]. Os peptídeos-KLH (1, 2, 3 isoladamente e o MIX dos três peptídeos) diluídos em NaCl 0,9% estéril foram utilizados para imunizar hamsters golden (*Mesocricetus auratus*), conforme descrito em GAMBOA, D, K. et al. Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology*, v. 135, p. 319-326, mar. 2008. hamsters fêmeas de quatro semanas de idade foram adquiridos do fornecedor Anilab de

Paulínea – SP. Após a chegada ao biotério, os animais tiveram um período de adaptação de uma semana.

[161]. Durante todo o experimento os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*. Para realização deste experimento foram constituídos seis grupos experimentais (grupo 1, peptídeo 1 + adjuvante; grupo 2, peptídeo 2 + adjuvante; grupo 3, peptídeo 3 + adjuvante; grupo 4 peptídeos 1, 2 e 3 + adjuvante; grupo 5, adjuvante; grupo 6, controle) compostos por dez animais por grupo. Os animais foram imunizados com peptídeos individuais ou combinados (MIX). Um grupo controle negativo não recebeu nenhum tipo de imunização. Outro grupo recebeu somente o adjuvante em veículo de imunização.

[162]. Os peptídeos sintéticos foram emulsionados na primeira imunização, em adjuvante completo de *Freund* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) e, nas demais imunizações, em adjuvante incompleto de *Freund* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Foi inoculado 20 µg de peptídeo-KLH por animal, no dorso e pela via subcutânea, num volume total de 100 µL. Foram aplicadas quatro doses deste inóculo com intervalos de 30 dias (TABELA 7). Soro não imune foi usado como controle negativo e soro imune foi obtido sete dias após a última imunização. As coletas de sangue foram realizadas por punção da veia safena dos animais previamente anestesiados.

TABELA 7 – PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO DOS HAMSTERS COM OS PEPTÍDEOS-KLH

<b>Dia</b>	<b>Dose de peptídeo (µg em 100 µL)</b>	<b>Imunização</b>
0	20	1ª
30	20	2ª
60	20	3ª
90	20	4ª

[163]. Após a coleta de sangue dos hamsters imunizados com os peptídeos um teste ELISA foi realizado para avaliar a presença de anticorpos específicos anti-peptídeos.

[164]. A sensibilização da placa com antígeno foi realizada aplicando-se 0,2 µg/poço de cada peptídeo, diluído em solução de tampão carbonato 0,05 M pH 9,6, e incubada *overnight* a 4°C. Após esta etapa as placas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (NaCl 0,9% - Tween 20 - 0,05%) e bloqueadas adicionando-se 120 µL de tampão de bloqueio (caseína 2% em PBS pH 7,4) por poço. Após incubação por uma hora em estufa a 37°C a placa foi lavada duas vezes. Os soros, diluídos 1:50 em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7,4 - Tween 20 0,05% - pool dos dez animais de cada grupo), foram aplicados nos poços e a placa foi incubada por uma hora em estufa a 37°C. Posteriormente a placa foi submetida a quatro lavagens para retirada das imunoglobulinas não ligadas ao antígeno. O conjugado anti-IgG total de hamster ligado a peroxidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) foi adicionado na concentração de 200 ng/mL. A placa foi incubada por mais uma hora em estufa a 37°C.

[165]. Após incubação foram realizadas quatro lavagens da placa e o substrato, composto por uma pastilha de OPD (2 mg) diluída em 10 mL de tampão citrato pH 5,0 e 2 µL de peróxido de hidrogênio a 30% foi aplicado. Após incubação por 15 minutos, ao abrigo de luz, foi efetuada a parada da reação adicionando-se 20 µL da solução de ácido sulfúrico 1:20 em toda a placa. A leitura foi realizada levando-se a placa imediatamente para o leitor de microplaca e a absorbância foi determinada no comprimento de onda de 492 nm.

[166]. Para avaliar a presença de anticorpos específicos anti-peptídeos, o soro dos hamsters imunizados com peptídeos foram avaliados por ELISA (FIGURA 6).

[167]. Todos os animais que foram imunizados com peptídeos apresentaram reatividade frente aos peptídeos 1, 2 e 3

isoladamente e frente ao pool dos peptídeos. Os peptídeos 1 e 2 isoladamente induziram reatividade igual ou próxima ao do MIX de peptídeos. Já em relação aos hamsters imunizados com o peptídeo 3, observa-se que estes tiveram maior reatividade frente ao MIX de peptídeos presentes na placa de ELISA. Os animais não imunizados e os que receberam apenas adjuvante não produziram anticorpos contra os peptídeos.

#### Avaliação da reatividade de IgGs

[168]. Para avaliar se os anticorpos anti-peptídeos produzidos em hamsters reconheceriam antígenos de *L. braziliensis* foi usada a técnica *Western blotting*.

[169]. Primeiramente, os antígenos de *L. braziliensis* foram submetidos à técnica de eletroforese em SDS-PAGE conforme item 2.5. Após a eletrotransferência, a membrana foi bloqueada com BSA 3%, Tween 20-0,05% em PBS pH 7,4 por uma hora sob agitação. A membrana foi então lavada, por quatro vezes, de cinco minutos e foi incubada com o pool do soro dos animais imunizados (diluídos 1:100 em tampão de incubação - BSA 3%, Tween 20-0,05% em PBS pH 7,4). Após a lavagem foi efetuada a adição do conjugado anti-IgG total de hamster ligado peroxidase em 100 ng/mL. Após incubação foram realizadas quatro lavagens e a revelação foi realizada com solução contendo 1 mg de DAB em 1,5 mL de Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,6 e 1,2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% por tira (cada tira foi incubada com 1,5 mL). A solução de revelação foi incubada até aparecimento das bandas e a reação foi parada por lavagem das tiras com PBS pH 7,4.

[170]. Após a realização da técnica *Western Blotting*, utilizando como antígenos o AS de *L. braziliensis* e soro de hamsters imunizados com peptídeos, foi possível constatar reatividade dos antígenos frente aos anticorpos dos animais imunizados com os

peptídeos 1, 2, 3 e para o MIX (FIGURA 6). Para os animais que receberam apenas o adjuvante não se verificou reatividade. Os hamsters que receberam o peptídeo 1 produziram anticorpos que reconheceram proteínas entre 76 e 150 kDa. Já o soro dos hamsters que receberam peptídeos 2 e 3 produziram anticorpos que reagiram com proteínas com massa entre 52 e 76 kDa de *L. braziliensis*, assim como o MIX dos peptídeos 1, 2 e 3. Os soros dos animais que não receberam os peptídeos (controles negativos) não reagiram frente aos antígenos de *L. braziliensis*.

[171]. A análise dos resultados obtidos demonstra que a metodologia selecionada (técnica de *Phage display*) foi adequada, visto que sequências peptídicas com homologia aos principais fatores de virulência de *Leishmania spp.* foram obtidas. Além disso, estas sequências demonstraram ser imunogênicas em modelos experimentais para leishmaniose e anticorpos anti-peptídeos reconheceram antígenos de *L. braziliensis*. Dessa forma, esses peptídeos podem ser utilizados para detecção de anticorpos em testes diagnósticos e em vacinas.

**LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 1:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 1:

Ser Lys Pro Gln Pro Asn Asn Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gly Ser

1

5

10

15

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Os aminoácidos de 1 a 15 podem ser substituídos por um resíduo de Ala, desde que esta substituição seja singular.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 2:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 2:

Thr Met Val Pro Lys Glu Pro Asn Pro Leu Ser Gly Leu Arg Lys

1                    5                    10                    15

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Os aminoácidos de 1 a 15 podem ser substituídos por um resíduo de Ala, desde que esta substituição seja singular.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 3:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 3:

Gly His Arg Met Pro Pro Thr Ser Val Ser Ala Leu Ala Arg Pro

1                    5                    10                    15

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Os aminoácidos de 1 a 15 podem ser substituídos por um resíduo de Ala, desde que esta substituição seja singular.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 4:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 4:

Glu Val Gln Thr Ala Pro Leu Pro Tyr Gln Gly Pro Thr Val Pro

1

5

10

15

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 5:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 5:

Gln Cys Trp Tyr Leu Val Thr Pro Leu Glu Cys Glu

1

5

10

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 6:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 6:

Xaa<sub>1</sub> Cys Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Gly Gly Cys Xaa<sub>4</sub>

1

5

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Xaa<sub>1</sub> é Glu, Gln, Gly, Ser, Tyr, Lys ou Thr; Xaa<sub>2</sub> é Leu, Gln, Ala, Ser, Glu, Arg ou Asp; Xaa<sub>3</sub> é Tyr ou Phe; Xaa<sub>4</sub> é Ser, Leu, Phe, Ala, Met ou Thr.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 7:**

**CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:**

(A) TAMANHO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 7:

Thr Cys His Pro Met Asp Asp Pro Gln Ser Cys Tyr

1                    5                                    10

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 8:**

**CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:**

(A) TAMANHO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 8:

Thr Cys Pro Lys Thr His Leu Pro Ala Ser Cys Trp

1                    5                                    10

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 9:**

**CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:**

(A) TAMANHO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 9:

Ala Cys Tyr Glu Val His Pro Phe Asp Arg Cys Pro

1                    5                    10

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 10:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 10:

Gln Cys Ser Pro Tyr Ser Pro Trp Gly Gln Cys Ala

1                    5                    10

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 11:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 11:

Tyr Cys Pro Trp Gly Tyr Cys Gln

1                    5

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 12:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 12:

Thr Cys His Pro Met Asp Asp Pro Gln Ser Cys Tyr

1                    5                    10

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 13:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 13:

Thr Cys Pro Lys Thr His Leu Pro Ala Ser Cys Trp

1                    5                    10

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 14:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 14:

Ala Cys Tyr Glu Val His Pro Phe Asp Arg Cys Pro

1                    5                    10

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 15:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 15:

Gln Cys Ser Pro Tyr Ser Pro Trp Gly Gln Cys Ala

1                    5                    10

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 16:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 16:

Tyr Cys Pro Trp Gly Tyr Cys Gln

1                    5

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 17:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 17:

Glu Val Gln Thr Ala Pro Leu Pro Tyr Gln Gly Pro Thr Val Pro

1                    5                    10                    15

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 18:**

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) TAMANHO: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 18:

Gln Cys Trp Tyr Leu Val Thr Pro Leu Glu Cys Glu

1                    5                    10

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Nenhuma.

**INFORMAÇÕES SOBRE SEQ ID NO 19:**

**CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:**

(A) TAMANHO: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGIA: linear

(D) TIPO MOLECULAR: Antígeno

(E) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO 19:

Xaa<sub>1</sub> Cys Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Gly Gly Cys Xaa<sub>4</sub>

1                    5

(F) SUBSTITUIÇÕES POSSÍVEIS: Xaa<sub>1</sub> é Gly, Ser, Glu, Tyr, Lys ou Thr; Xaa<sub>2</sub> é Leu, Gln, Ala, Ser, Glu, Arg, ou Asp; Xaa<sub>3</sub> é Tyr ou Phe; Xaa<sub>4</sub> é Ser, Leu, Phe, Ala, Met ou Thr.

### **REIVINDICAÇÕES**

1. PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E APLICAÇÕES, caracterizados pelo fato de que podem possuir qualquer das sequências de aminoácidos identificadas como SEQ ID No 1 a SEQ ID No 16.

2. PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, caracterizado por consistir em uma variante de qualquer peptídeo descrito na reivindicação 1.

3. PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, caracterizado por consistir em uma combinação de pelo menos um peptídeo descrito nas reivindicações 1 e 2.

4. PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com qualquer das reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por possuir propriedades antigênicas de *Leishmania*.

5. PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por compreender uma mistura de pelo menos duas sequências de que tratam as reivindicações 1 e 2, podendo ainda compreender a formação de polímeros constituídos da repetição de uma sequência peptídica da qual tratam as reivindicações 1 e 2 podendo ser separadas por qualquer método de separação como espaçadores e *linkers*.

6. PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado por serem produzidos pela tecnologia do DNA recombinante, podendo ser produzidos por síntese química.

7. USO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, compreendendo um método de detecção de infecção por *Leishmania spp.*, caracterizado por incluir as seguintes etapas:

- a. coletar a amostra;

b. colocar a amostra em contato, após processamento, com pelo menos um dos peptídeos referidos nas reivindicações de 1 a 3;

c. detecção da reação entre componentes da amostra e peptídeos descritos nas reivindicações 1 a 3, por técnicas adequadas.

8. USO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com a reivindicação 7 (a), caracterizado por ser qualquer amostra que contenha anticorpos, incluindo sangue.

9. USO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com a reivindicação 7 (b), caracterizado pelo fato de que anticorpos e células mononucleares, não necessariamente juntas, serem separadas das amostras e por possibilitar a interação entre antígeno e anticorpo, induzindo a proliferação de células e a produção e citocinas frente a antígenos.

10. USO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com a reivindicação 7 (c), caracterizado por incluírem, mas não se limitando às seguintes técnicas:

a. ELISA;

b. *Western Blotting*;

c. Imunoprecipitação;

d. Aglutinação;

e. Radioimunoensaio;

f. Imunofluorescência;

g. Demais técnicas que possibilitem a detecção de imunocomplexos, proliferação celular e produção de citocinas.

11. USO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que os peptídeos descritos nas reivindicações 1 a 3 podem ser utilizados em biosensores.

12. USO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que os peptídeos descritos nas reivindicações de 1 a 3 podem ser utilizados como indutores de resposta imunogênica e antigênica.

13. USO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que os peptídeos descritos nas reivindicações de 1 a 3 podem ser utilizados como vacinas.

14. USO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com as reivindicações 13 ou 14, caracterizado pelo fato de os peptídeos descritos nas reivindicações 1 a 3 podem estar associados a veículos fisiologicamente aceitáveis, preservativos e, quando necessário, a adjuvantes.

15. USO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que compreende um kit de diagnóstico para leishmaniose, contendo quaisquer combinações dos peptídeos descritos nas reivindicações de 1 a 3, além de reagentes, dispositivos e instruções necessárias para a execução de um imunoenensaio.

16. USO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado por fazerem parte de preparações de preparação de composições imunológicas para induzir uma resposta imunogênica, podendo ser protetora *in vivo*, permitir a avaliação da exposição de indivíduos ao *Leishmania spp.*, contribuir na avaliação da resposta imune e classificação da doença em indivíduos infectados por *Leishmania spp.*.

17. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS descritos nas reivindicações 1 a 3, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a. Coletar amostras;
- b. Obtenção de anticorpos-antígeno específicos a partir de amostras coletadas em (a);
- c. Seleção de peptídeos miméticos de antígenos de *leishmania* a partir de bibliotecas de peptídeos expressos em fagos (*Phage Display*).

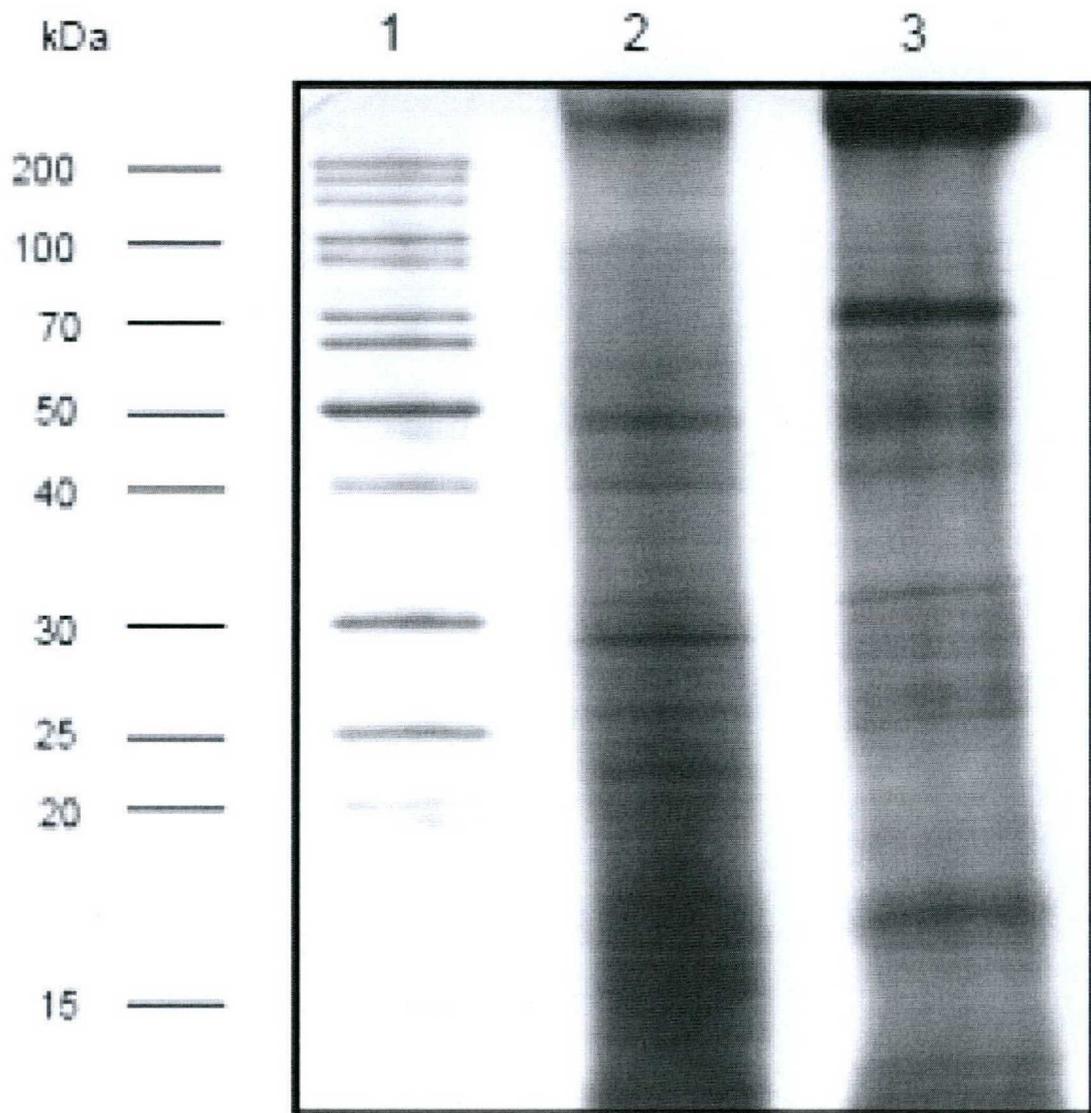
18. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que os anticorpos podem ser obtidos de amostras de indivíduos infectados com *Leishmania spp.* em qualquer fase.

19. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que os anticorpos podem ser obtidos de amostras de animais infectados com *Leishmania spp.* em qualquer fase.

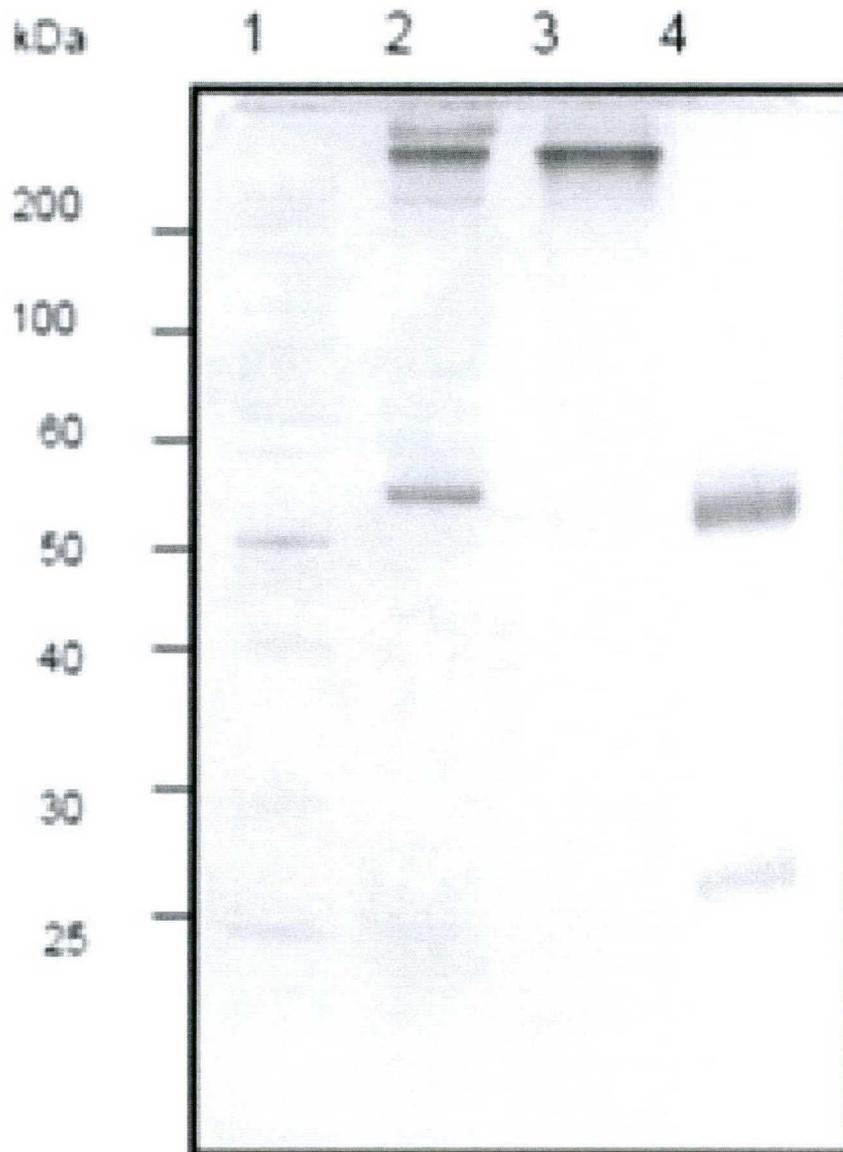
20. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que os anticorpos são purificados das amostras por métodos de precipitação, incluindo cromatografia de afinidade e *immunoblotting*.

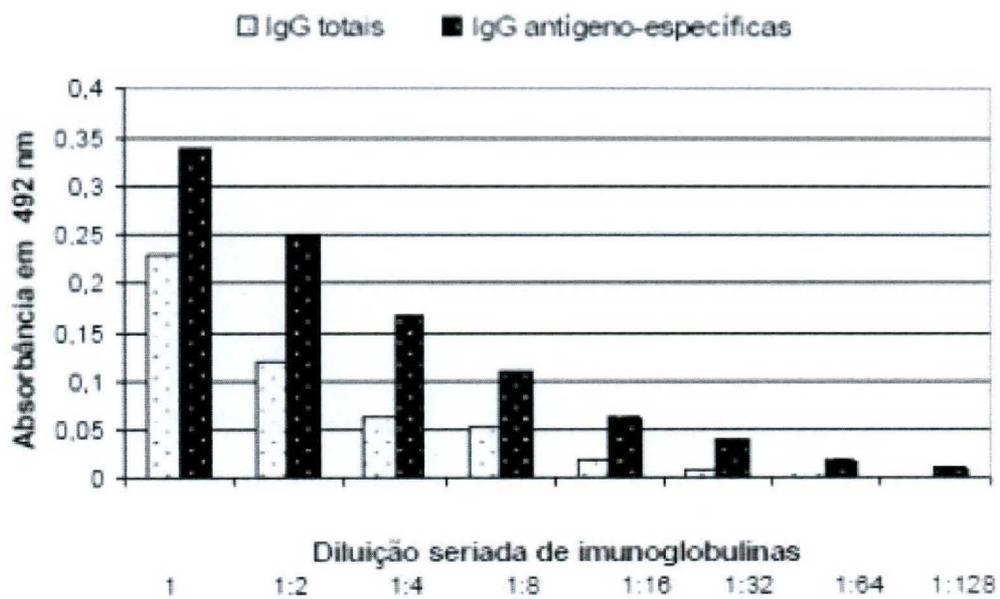
21. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pela utilização de anticorpos antígeno-específicos de *Leishmania spp.* podendo conter depleção de fagos reativos a anticorpos antígeno-específicos de leishmaniose.

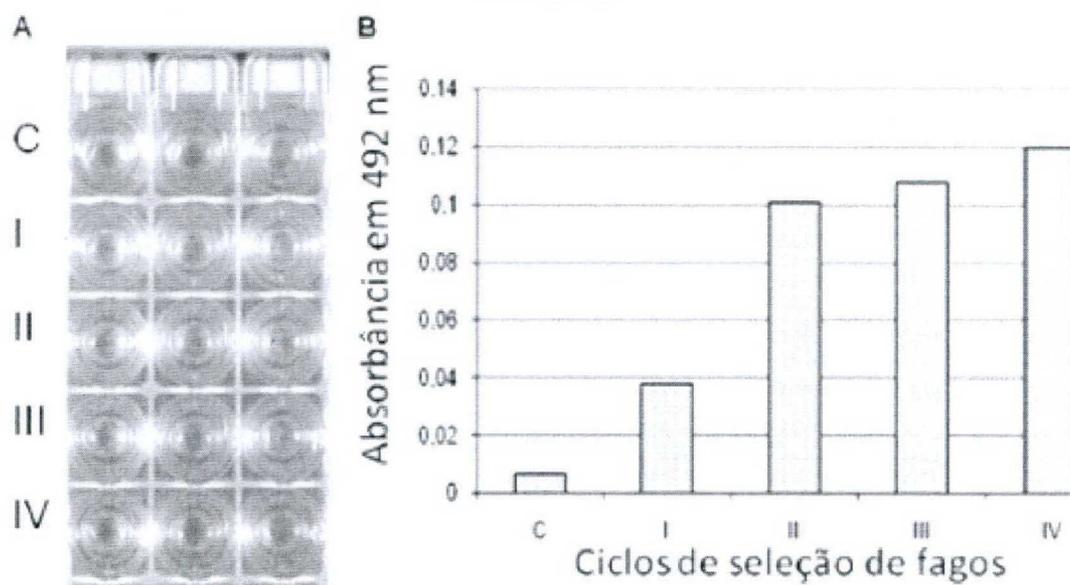
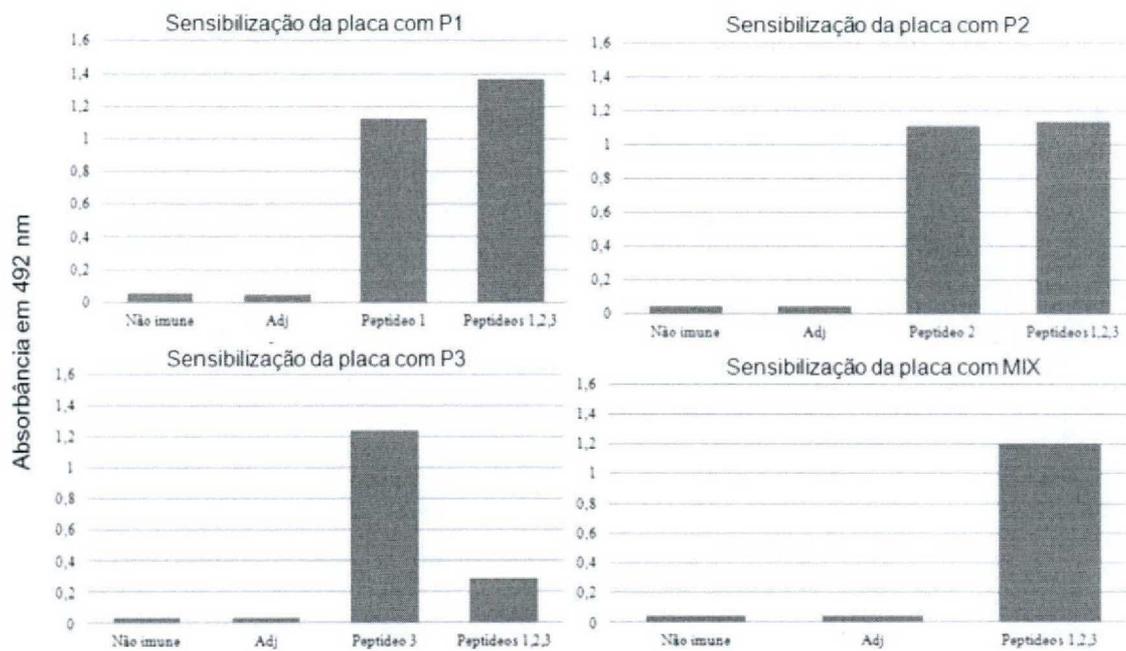
**FIGURA 1**



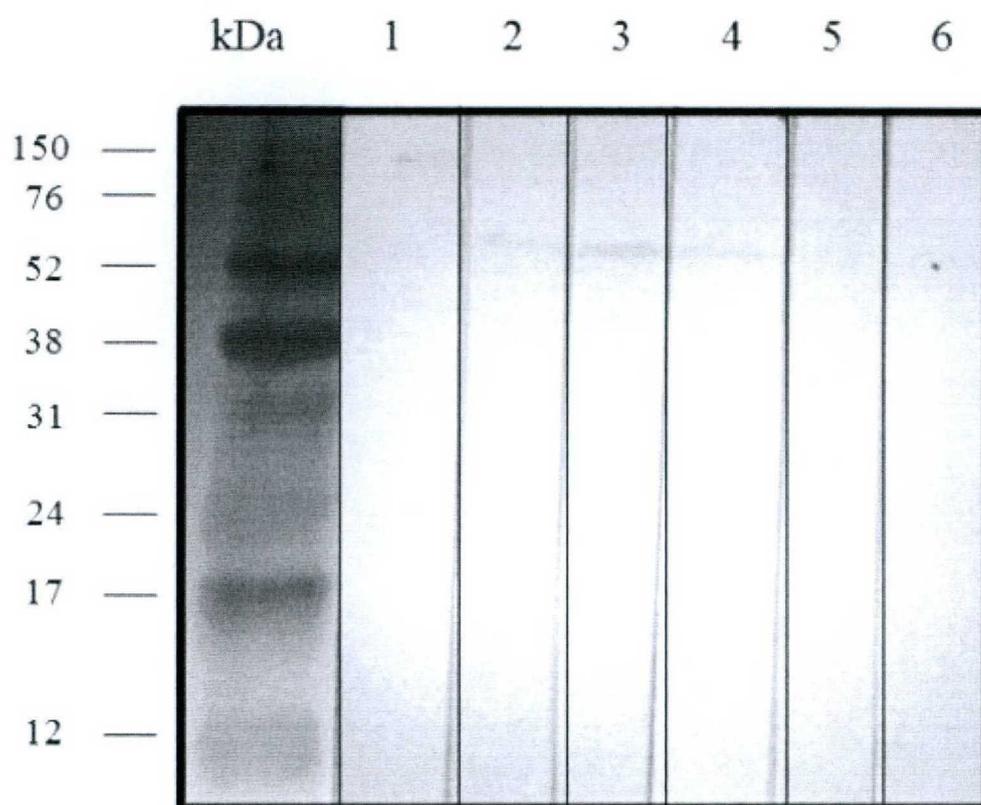
**FIGURA 2**



**FIGURA 3****FIGURA 4**

**FIGURA 5****FIGURA 6**

**FIGURA 7**



**RESUMO****PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DE *Leishmania spp.*, PROCESSO PARA SUA  
OBTENÇÃO E APLICAÇÕES**

A presente invenção trata da caracterização de peptídeos miméticos de *Leishmania spp.* utilizados para induzir resposta imunogênica e para testes de diagnóstico. A presente invenção compreende a identificação de mimotopos de antígenos de *Leishmania spp.*. Os peptídeos descritos na presente invenção apresentam utilidade em métodos, kits de diagnóstico e biosensores, bem como a composições imunológicas que os contenham como princípio ativo, tais como vacinas.