



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

(21) BR 102020024371-3 A2



(22) Data do Depósito: 30/11/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 10/05/2022

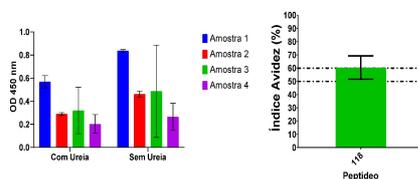
(54) **Título:** USO DE PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S118 PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19 USANDO PLATAFORMA DE IMUNODIAGNÓSTICO

(51) **Int. Cl.:** C07K 7/08; G01N 33/569.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA; IMUNOVA ANÁLISES BIOLÓGICAS LTDA.

(72) **Inventor(es):** VANETE THOMAZ SOCCOL; GABRIELA DO NASCIMENTO FERREIRA; CARLOS RICARDO SOCCOL; ELIEZER LUCAS PIRES RAMOS; RAPHAEL APARECIDO BOSCHERO; MANUEL SANTINI HOSPINAL; LUCIANA PORTO VANDENBERGHE; BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO; MAX INGBERMAN; JEAN MICHEL DELA VEDOVA COSTA.

(57) **Resumo:** USO DE PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S118 PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19 USANDO PLATAFORMA DE IMUNODIAGNÓSTICO. A presente invenção trata da proteção de novo antígeno peptídico sintético e seu uso em imunodiagnóstico da doença COVID-19. O P.SC2.S.118 compreende uma sequência de aminoácidos detectado pelas metodologias capazes de simular epítipo de SARS-CoV-2. Os métodos de diagnóstico que podem empregar este peptídeo são baseados na interação do antígeno com componentes de amostras biológicas e posterior revelação da interação entre estes. O novo antígeno foi sintetizado quimicamente, avaliado e validado com soro de pacientes positivos para COVID19 e controles negativos. O antígeno em questão P.SC2.S.118 (SEQ ID No. 1) detecta resposta humoral e o estágio da resposta com a identificação das diferentes imunoglobulinas (IgM, IgG e IgTotal), sendo útil ao diagnóstico da COVID-19 por técnicas imunológicas, como o ensaio imuno-enzimático (ELISA indireto), mas não se limitando a esta. O teste ELISA com o uso do novo antígeno P.SC2.S.118 apresentou um índice de avidéz de 60% e a relação entre as absorvâncias das amostras positiva e negativa está entre 2 e 4, dependendo do conjugado utilizado. O(s) método(s) e o antígeno usado na presente invenção não apresentam toxicidade, não (...).



USO DE PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S118 PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19 USANDO PLATAFORMA DE IMUNODIAGNÓSTICO

Campo da Invenção

[001] A presente invenção reivindica um peptídeo (SEQ.ID.No.1) utilizado como antígeno sintético para imunodeteção de COVID-19, incluindo a sequência de aminoácidos do antígeno empregado (peptídeo sintético mimético P.SC2.S118), e seu uso em testes sorológicos como o ensaio imuno-enzimático (ELISA). Este peptídeo apresenta rápida produção em larga escala e induz ligação de anticorpos de alta avidéz com soro IgG positivo para COVID-19.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002] A pandemia da doença COVID-19, causada pelo agente etiológico coronavírus, da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), foi declarada pela organização mundial da saúde em 11 de março de 2020. Em outubro de 2020, 37 601 848 casos já tinham sido confirmados e 1 077 799 mortes no mundo (WHO, World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. 2020. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em 13/10/2020). A COVID-19 é uma patologia pulmonar, caracterizada por febre, tosse seca e cansaço, e a inflamação à ela associada é grave podendo levar à insuficiência respiratória, choque e, finalmente, à morte.

[003] Para a maioria dos pacientes, a COVID-19 pode afetar apenas os pulmões, por ser principalmente uma doença respiratória. A infecção é transmitida de humano para humano por meio de secreções contaminadas. A COVID-19 tem um provável período de incubação assintomática entre 2 e 14 dias durante o qual o vírus pode ser transmitido. Por esse motivo há rápida disseminação do vírus (PROMPETCHARA, Eakachai; KETLOY, Chutitorn; PALAGA, Tanapat. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned

from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2020, 38.1: 1-9).

[004] A entrada do coronavírus nas células hospedeiras é mediada pela glicoproteína transmembrana spike (S) que forma três subunidades idênticas, as quais se propagam na superfície viral. São duas as subunidades funcionais responsáveis pela ligação ao receptor da célula hospedeira (subunidade S₁) e fusão de membranas virais e celulares (subunidade S₂) (WALLS, Alexandra C., et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 2020).

[005] O SARS-CoV-2 leva à infecção de células-alvo que expressam ACE2, uma proteína transmembrana expressa na superfície de diversas células do corpo, como o epitélio do sistema respiratório, como por exemplo, as células alveolares do tipo 2. As células infectadas pelo vírus podem escapar do interferon tipo I (IFN I), que são proteínas solúveis produzidas pelas células dendríticas e têm potentes atividades antivirais, resultando em replicação viral não controlada (ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier Brasil, 2008).

[006] Uma vez que os humanos não têm imunidade pré-existente contra SARS-CoV-2, há uma necessidade urgente de desenvolver terapêuticas e vacinas para mitigar a atual pandemia e para prevenir o ressurgimento de COVID-19 no futuro. Os testes diagnósticos utilizados são, em sua maioria, moleculares ou sorológicos. Os testes moleculares são padrão ouro para o diagnóstico e são baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) pela transcriptase reversa (RT) de forma quantitativa (q), o RT-qPCR (RU2731390C1). Testes sorológicos detectam a presença de anticorpos específicos pela interação de antígeno-anticorpo, mensurando as respostas de anticorpos aos patógenos em fluidos corporais, especialmente no soro, plasma ou

urina (LI, Xiaowei, et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020).

[007] Os últimos surtos de doenças causadas pelo Coronavírus foram a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) e a síndrome respiratória aguda grave (SARS). Em ambas a alta mortalidade e a ausência de terapias eficazes levaram ao uso de soro convalescente. Anticorpos, ou imunoglobulinas, que atuam como mediadores da imunidade humoral específica acoplando vários mecanismos efetores que servem para eliminar os antígenos a eles ligados (PESSOA, Beatriz Mella Soares, et al. Imunoterapias no tratamento da COVID-19. *Desafios-Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins*, 2020, 7. Especial-3: 97-108).

[008] A imunização passiva é uma forma de obter imunização imediata contra agentes infecciosos pela administração de anticorpos específicos, para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas humanas. Enquanto as vacinas requerem a indução de uma resposta imune que leva tempo para se desenvolver e varia dependendo do receptor (CASADEVALL, Arturo, et al. The convalescent sera option for containing COVID-19. *The Journal of clinical investigation*, 2020, 130.4: 1545-1548).

[009] Um princípio geral da terapia passiva com anticorpos é que ela é mais eficaz quando usada para profilaxia do que para tratamento de doenças. Quando usada para terapia, o anticorpo é mais eficaz quando administrado logo após o início dos sintomas. A razão para a variação temporal na eficácia não é bem compreendida, mas pode ser que o anticorpo passivo atua neutralizando o inóculo inicial, que é provavelmente muito menor do que o da doença estabelecida (ROBBINS, John B.; SCHNEERSON, Rachel; SZU, Shousun C. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against

infectious diseases by inactivating the inoculum. *Journal of Infectious Diseases*, 1995, 171.6: 1387-1398).

[010] Com isso, se mostra necessário o desenvolvimento de novos antígenos capazes de gerar anticorpos neutralizantes. Antígeno é uma molécula capaz de interagir com um anticorpo ou célula do sistema imunológico, e epítipo é a menor porção desta molécula onde efetivamente ocorre a interação, e uma grande variedade de antígenos pode ser utilizada em testes sorológicos, os quais refletem diretamente na especificidade alcançada pelo teste (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology*. ed. 9. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2017).

[011] Peptídeos sintéticos estão sendo utilizados como antígenos promissores para diagnósticos sorológicos e produção de anticorpos policlonais e monoclonais. Podem ser produzidos pela técnica de síntese química em suporte sólido utilizando aminoácidos com grupos protetores, como Fmoc (FRANK, R. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *Journal of Immunological Methods*, v. 267, n. 1, p.13–26, 2002). A sua síntese pode ser realizada em equipamentos automatizados, propiciando reprodutibilidade e agilidade na produção.

[012] A fim de investigar a soroconversão durante a patogênese de COVID-19, foram avaliadas amostras de soro e divididos em seis grupos de acordo com o tempo de coleta após o início da doença. De 4 a 10 dias após o início dos sintomas, o diagnóstico com kit para detectar a imunoglobulina A (IgA) exibiu a maior taxa de diagnóstico positivo de 88,2%, enquanto o kit IgM e IgG apresentaram taxas de detecção de 76,4% e 64,7%, respectivamente (MA, Huan, et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cellular & Molecular Immunology*, 2020, 1-3).

[013] A detecção de IgA mostra a maior sensibilidade durante cerca

de 4 a 25 dias após o início da doença sendo o pico durante 16–20 dias após o início da doença. Para IgG específico a detecção foi a mais baixa nos estágios iniciais da doença, mas aumentou 15 dias após o início da doença, atingindo o seu pico entre 21–25 dias após o início da doença e permaneceu em uma leitura relativamente alta até 31–41 dias, sugerindo que o IgG é poderoso para o diagnóstico em estágios posteriores. A detecção de IgM atingiu seu pico nos estágios iniciais da doença, com leituras menores quando comparadas com IgA ou IgG (MA, Huan, et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cellular & Molecular Immunology*, 2020, 1-3).

[014] A determinação da avidéz de anticorpos IgG tem sido amplamente utilizada em testes imunoenzimáticos para discriminar infecções ativas que já ocorreram, e infecções primárias e secundárias. Estes testes baseiam-se na afinidade do anticorpo que é definida pela força de ligação com o antígeno, sendo que esta interação é resultante de forças atrativas e repulsivas entre as moléculas envolvidas (SILVA, I. J. DA. Avidéz de IgG na Toxoplasmose: padronização do pH como caotrópico para quantificação direta de anticorpos de baixa avidéz. p. 85, 2011).

[015] A avidéz dos anticorpos pode aumentar conforme eles amadurecem por expansão colonial, hipermutação e seleção de afinidade no centro germinativo (LIU, Tiancheng, et al. High-Accuracy Multiplexed SARS-CoV-2 Antibody Assay with Avidity and Saliva Capability on a Nano-Plasmonic Platform. *bioRxiv*, 2020).

[016] Dessa forma, a força de ligação resultante de todas essas interações é denominada avidéz de anticorpos ou afinidade funcional. Este conhecimento tem sido amplamente utilizado em testes imunoenzimáticos, como o teste de ensaio imunoenzimático (ELISA), que avaliam a avidéz da imunoglobulina G (IgG) em resposta a agentes infecciosos e a sua relação com o tempo de infecção.

[017] A mudança na afinidade dos anticorpos IgG durante a resposta imune adaptativa depende da maturação e evolução temporal da resposta imune. A medida desta afinidade permite a distinção entre uma infecção primária recente e uma infecção passada ou crônica, e tem sido, nos últimos anos, uma ferramenta eficaz no diagnóstico temporal de diversas doenças infecciosas. No ELISA, a avidéz dos anticorpos IgG pode ser determinada pelo método da diluição, em que o agente caotrópico é adicionado ao diluente do soro, impedindo a formação do complexo antígeno-anticorpo (SILVA, I. J. DA. Avidéz de IgG na Toxoplasmose: padronização do pH como caotrópico para quantificação direta de anticorpos de baixa avidéz. p. 85, 2011).

[018] O atual estado da arte desta invenção e as inovações nesse campo, foram avaliadas por pesquisa de documentos patentários referentes a antígenos peptídicos de SARS-CoV-2 que induzem a ligação de anticorpos de alta avidéz e sua utilização em testes sorológicos utilizando a técnica de ELISA para diagnóstico de COVID-19 em humanos.

[019] Como a pandemia de COVID-19 é razoavelmente recente são poucas as soluções tecnológicas publicadas em bases de dados patentários, como o INPI e Patente Scope, relacionadas ao SARS-CoV-2 até o presente momento. Logo, não foram encontrados documentos referentes à utilização de peptídeos de alta avidéz da proteína S do SARS-CoV-2 como antígenos em imunoenaios e imunoterapias para controle da COVID-19.

[020] Em busca na base Patente Scope foram encontradas algumas patentes relacionadas ao SARS-CoV (*Síndrome Respiratória Aguda Grave*) e testes diagnósticos utilizando a técnica de ELISA para detecção, empregando as proteínas recombinantes M e N (CN1570643A) e peptídeos da proteína S (CN100467484C), os quais

foram capazes de detectar anticorpos IgG e IgM humanos frente ao SARS-CoV. O uso de proteínas recombinantes para detectar anticorpos IgM, IgG e IgA por ELISA foi utilizada como parte de um teste diagnóstico para COVID-19 (RU0002730897). Essa técnica não foi registrada em bases patentárias para o SARS-CoV-2 no Brasil.

[021] Em relação à avidéz dos peptídeos de SARS-CoV-2 não foi encontrado nenhum registro em bases de dados de patentes, tanto nacionais quanto internacionais. Os métodos de determinação da avidéz foram avaliados em relação ao agente anti-infeccioso IgG, para anti-citomegalovírus humano (US20070099295), para determinação quantitativa ou qualitativa de um anticorpo por reação com seu antígeno cognato, desestabilização seletiva de complexos formados com anticorpos de baixa afinidade e medição do grau de ligação, e detecção de infecção aguda ou recente de sarampo, primeira infecção por *citomegalovírus*, *vírus de Epstein-Barr* ou *vírus herpes simplex*.

Descrição da abordagem do problema técnico

[022] A presente invenção inclui um peptídeo sintético P.SC2.S.118 de SARS-CoV-2 de alta avidéz, para ser utilizado como antígeno em testes sorológicos.

[023] Os testes sorológicos, avaliando anticorpos (IgA, IgM e IgG), as imunoglobulinas G se destacam devido a possibilidade de detecção durante um longo período pós-sintomas ou até mesmo em casos assintomáticos. Dentre as opções para os testes sorológicos, as imunocromatografias, por serem do tipo point-of-care, permitem obter resultados rápidos com praticidade. Porém, são de alto custo e a especificidade e sensibilidade variam, o que implicam diagnósticos falso-negativos.

[024] Por outro lado, os testes sorológicos pela técnica de ELISA suprem as limitações apresentadas das outras técnicas quando aplicadas nestas situações, além de ser uma técnica bem consolidada, bem difundida entre laboratórios de diagnóstico e passível de automação, além de apresentarem uma variedade de possíveis antígenos a serem empregados, os quais refletem diretamente na especificidade alcançada pelo teste.

[025] Na presente invenção, ao invés de proteínas recombinantes como antígenos, utilizam-se peptídeos sintéticos, explorando assim o potencial antigênico de poucos, ou apenas um epítopo presente na molécula. A restrição de epítopos disponíveis para a interação antígeno-anticorpo pode oferecer uma vantagem de especificidade ao teste.

[026] Peptídeos sintéticos podem ser produzidos rapidamente em larga escala utilizando equipamentos automatizados, como o peptídeo apresentado nesta invenção. Portanto, tratando-se do teste tipo ELISA, onde é utilizada massa de antígenos na escala de nanogramas a cada teste. A síntese química de peptídeos se torna uma opção viável e rápida para produção em larga escala do teste para diagnóstico de COVID-19.

[027] Está bem estabelecido que os ensaios de avides de IgG utilizando reagentes caotrópicos (Ureia, Tiocianato de Guanidina) que aumentam a entropia do sistema interferindo com interações intramoleculares, podem ser usados em nível de diagnóstico. Esta técnica permite discriminar entre uma infecção aguda e uma infecção adquirida, no passado distante, para uma variedade de agentes infecciosos, incluindo SARS e com isso determinar a avides dos anticorpos IgG.

[028] As tecnologias que utilizam peptídeos da proteína S do SARS-CoV-2 de alta avides não foram encontradas em pesquisas nas bases de dados de patentes, dessa forma a presente invenção tem como

objetivo um teste eficiente, de produção rápida, de fácil execução e de baixo custo que viabiliza economicamente o diagnóstico de COVID-19.

Descrição detalhada da Invenção

[029] A presente invenção se refere a um novo antígeno peptídeo sintético P.SC2.S.118 e o método para determinar a avidéz de anticorpo IgG de anti SARS-CoV-2 em um paciente suspeito de ter sido infectado pelo agente infeccioso, utilizando a técnica de ELISA.

[030] Este método compreende as etapas:

Sensibilização do antígeno isolado do SARS-CoV-2 em uma placa, no caso o novo peptídeo P.SC2.S.118 em um tampão deixando o antígeno em fase líquida para revestir a fase sólida e criar um antígeno de fase sólida. Lavar e em seguida bloquear com solução de bloqueio, sob tempo e condições adequadas.

Adicionar uma amostra de soro de paciente positivo, em solução, em condições adequadas para ocorrer a interação de proteínas com afinidade específica aos anticorpos. Em seguida, lavar a fase sólida revestida da etapa.

Considerando dois ensaios, um tratamento de desnaturação, com Ureia 6M em PBS, foi introduzido em um dos ensaios para remover anticorpos fracamente ligados ao antígeno, deixando apenas os anticorpos com uma forte afinidade, e após o tempo adequado, lavar a fase sólida. O segundo ensaio segue para próxima etapa sem o tratamento com Ureia.

Adicionar um anticorpo secundário conjugado a uma enzima, mais especificamente uma peroxidase como a HRP (horseradish peroxidase), mas não se restringindo a esta, ao primeiro e segundo ensaios onde ocorrem reações com o marcador

conjugado a proteína da etapa anterior que permite a detecção da presença dos anticorpos anti-SARS-CoV-2.

Revelar a reação detectar o sinal gerado pela enzima geradora de sinal no primeiro e no segundo ensaio. Determinar a razão entre o sinal obtido no segundo ensaio e o sinal obtido no primeiro ensaio, em que a razão representa a proporção de agente anti-infeccioso humano de alta avidéz de anticorpo IgG presente na amostra do paciente e determinar o índice de avidéz.

[031] Deve-se considerar que esta invenção não se limita à metodologia, protocolos e reagentes específicos descritos, enquanto tal, que podem variar. Também se deve entender que a terminologia aqui utilizada tem apenas o propósito de descrever procedimentos particulares e não se destina a limitar o âmbito da presente invenção, que será limitado apenas pelas reivindicações anexas.

[032] A presente invenção é descrita em seguida utilizando exemplos, mas não se limitando a estes.

Exemplo 1: Método de obtenção do peptídeo.

[033] O peptídeo 118 é proveniente de modificações na estrutura primária de um fragmento da proteína S do vírus SARS-CoV-2, a qual foi obtida a partir da anotação desta proteína (QIG55994) no genoma de SARS-CoV-2 (MT126808.1) sequenciado em indivíduos diagnosticados com COVID-19 no Brasil. Essas modificações conferem maior estabilidade físico-química e hidrofiliçidade à molécula, e com isso **não se trata** de uma sequência natural, mantendo a originalidade da sequência.

[034] Este peptídeo foi engenheirado e selecionado por meio de técnicas *in silico* e sintetizado quimicamente em equipamento automatizado MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments) pela técnica de síntese em suporte sólido utilizando aminoácidos com grupos

de proteção Fmoc (FRANK, R. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *Journal of Immunological Methods*, v. 267, n. 1, p.13–26, 2002). Após síntese, este foi purificado com solvente éter terc-butil-metil e quantificado utilizando kit Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific).

[035] O peptídeo é congelado em frascos de vidro cobertos com filme PVC em freezer -80°C durante um período mínimo de 4 horas. Após o congelamento, os frascos são perfurados com agulha injetável e levados ao liofilizador. As amostras são liofilizadas a temperatura de -45°C durante 24 horas ou até pressão constante e inferior a 50 mbar. .

Exemplo 2: Validação do peptídeo como antígeno para diagnóstico por ensaio imunoenzimático - ELISA

[036] A avaliação do peptídeo (SEQ.ID.No.1) como antígeno específico para SARS-CoV-2 foi realizada pela técnica ELISA, avaliando se há interação do peptídeo com anticorpos presentes em indivíduos positivos para COVID-19. A adequada detecção da afinidade específica para SARS-CoV-2 é possível, comparando-se a reatividade entre amostras de indivíduos positivos e negativos.

[037] Como as variáveis do teste ELISA podem influenciar os resultados positivos e negativos, é necessário definir condições ótimas para a reação. Estas condições devem apresentar como resultado de leitura da reação valores com grande diferença e proporção entre as amostras positivas e negativas. Portanto, a padronização das condições ocorreu variando os parâmetros: concentrações do peptídeo (10 a 150 ng/poço); concentração de solução tampão de bloqueio (Bovine Serum Albumin 2 a 5%); diluição do soro (1:50 a 1:250); tipo de conjugado (anti-human-IgG, anti-human-IgM e anti-human-Ig total), diluição do conjugado (1:5000 a 1:25000), teste com peroxidase ou

biotina, no caso conjugado ligado a biotina teste com diluição de neutrAvidin (1:7500 a 1:15000).

[038] Para realização do diagnóstico, o novo peptídeo P.SC2.S.118 deve ser imobilizado em um suporte sólido (para que possa se ligar e permanecer adsorvido). Os suportes sólidos incluem microplacas de 96 poços, que podem ser de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno ou poliestireno, mas não se restringindo a estas.

[039] Em seguida, é adicionada ao suporte sólido uma amostra de fluido biológico como sangue, soro, plasma, saliva contendo anticorpos anti-COVID-19, obtida de pacientes positivos para COVID-19, os soros devem ser diluídos em tampão de incubação (0,25% de caseína em PBS pH 7,4 - Tween 20 0,05%). Estes anticorpos irão se ligar a um ou mais peptídeos que apresentem a sequência do peptídeo P.SC2.S.118.

[040] Moléculas que não interajam especificamente com o antígeno imobilizado aos suportes são removidas por lavagem com solução de lavagem (NaCl 0,9% - Tween 20 0,05%).

[041] Em seguida, um anticorpo secundário marcado ou uma proteína conjugada a uma enzima ou marcador são diluídos na solução de incubação e adicionados aos poços, onde se ligam aos anticorpos provenientes da amostra biológica. O suporte sólido é então lavado novamente com solução de lavagem para a remoção de anticorpos não ligados.

[042] A etapa seguinte do processo de diagnóstico consiste na adição de solução de revelação (TMB- 5,5'-tetrametilbenzidina) nos poços, seguida de adição de solução de parada (ácido sulfúrico 5%). O sinal emitido após a adição dos substratos enzimáticos pode ser colorimétrico, quimioluminescente ou fluorescente, e a quantificação deste sinal indica a presença ou não de anticorpos anti-COVID-19.

Exemplo 3: Teste ELISA de avidéz para datação da infecção

[043] A avaliação da avidéz do peptídeo (SEQ.ID.No.1), antígeno específico para SARS-CoV-2, foi realizada pela técnica de ELISA de avidéz, avaliando a força com que os anticorpos IgG, presentes em indivíduos positivos para COVID-19, e antígeno se ligam. A adequada detecção da afinidade específica para SARS-CoV-2 é possível comparando-se a reatividade entre amostras de indivíduos positivos e negativos.

[044] Porém, as variáveis do teste ELISA podem influenciar na distinção entre resultados positivos e negativos, implicando na necessidade de estabelecer condições ótimas para a reação. Estas condições devem apresentar como resultado de leitura da reação valores com grande diferença e proporção entre as amostras positivas e negativas.

[045] A padronização das condições para chegar às condições ideais foi realizada variando os parâmetros de concentrações do peptídeo; concentração de solução de bloqueio (BSA 3 a 5%); diluição da amostra, entre 1:300 a 1:100; diluição da solução de anticorpo conjugado anti-human-IgG com peroxidase ou biotina de 1:7500 - 1:25000.

[046] Para realização do ELISA de avidéz, o antígeno peptídeo 118 deve ser imobilizado em um suporte sólido, como uma placa de 96 poços, que podem ser de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno ou poliestireno.

[047] Em seguida, uma amostra de fluido biológico, como sangue ou soro, de pacientes IgG positivos para COVID-19, contendo anticorpos anti-COVID-19 que se ligam ao peptídeo imobilizado na placa. As moléculas que não se ligam especificamente são lavadas com solução de lavagem.

[048] Na próxima etapa é adicionada uma solução de Ureia a 6M, em que os anticorpos de baixa avidéz serão removidos com a lavagem, devido a menor força de interação entre antígeno/anticorpo.

[049] Em seguida, um anticorpo secundário conjugado com uma enzima, são diluídos e adicionados aos poços, reagindo com o anticorpo primário devem ser lavados para remoção dos anticorpos não ligados. Como o anticorpo secundário é marcado para emitir um sinal detectável quando reagir com o anticorpo primário, detectando o antígeno indiretamente.

[050] A reação é então revelada emitindo um sinal colorimétrico, devido a enzima peroxidase do anticorpo secundário, e em seguida a adição de solução de parada. A reação é lida em espectrofotômetro a 450 nm.

[051] O índice avidéz é obtido da relação da equação 1, onde valores acima de 50% são considerados alta avidéz, entre 50 e 60% média avidéz, a abaixo de 5% baixa avidéz. O peptídeo 118 tem índice avidéz entre 60 e 70%, como apresentado na Figura 2.

$$\frac{Abs U^+}{Abs U^-} 100$$

[052] Sumário da Invenção

[053] A presente invenção se refere a um peptídeo sintético, cuja sequência de aminoácidos foi obtida por técnicas *in silico* e sintetizado quimicamente em equipamento automatizado pela técnica de síntese em suporte sólido utilizando aminoácidos com grupos de proteção Fmoc. A síntese química permite seu uso como novo antígeno em um teste sorológico para diagnóstico de COVID-19, doença causada por o vírus SARS-CoV-2. A sequência do peptídeo está expressa nesse documento como SEQ.ID.No.1. Esta invenção reivindica uma metodologia para imunodiagnóstico da COVID-19 humano utilizando novo antígeno peptídeo sintético P.SC2.S.118 com diferentes conjugado e teste de avidéz. Assim sendo, a presente invenção pleiteia a proteção do peptídeo 118 a ser empregado em diferentes métodos e kit de diagnóstico sorológico para COVID-19.

[054] Descrição dos desenhos

[055] Figura 1- Relação entre as diferentes imunoglobulinas para o peptídeo P.SC2.S.118. Relação entre leitura das absorvâncias de amostras positivas e negativas, utilizando diferentes conjugados.

[056] Figura 2- Gráfico Índice Avidéz para cinco grupos IgG positivos do peptídeo P.SC2.S.118. Diferentes amostras positivas foram avaliadas em relação a mudança na leitura das absorvâncias, a 450 nm, ao utilizar ureia como tratamento desnaturante. E assim determinado o Índice Avidéz.

REIVINDICAÇÕES

1. ANTÍGENO PEPTÍDEO MIMÉTICO P-SC2-S118 **caracterizado por** consistir de sequência artificial de aminoácidos (SEQ ID N° 1), pelo fato de ser capaz de reconhecer anticorpos anti-SARS-CoV-2, anti-Imunoglobulinas M, IgG e anti-IgTotal.
2. ANTÍGENO PEPTÍDEO MIMÉTICO P-SC2-S118, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser usado em sua forma original, com ou sem modificação em suas extremidades, podendo ser usado na forma de polímeros constituídos de repetições de uma sequência peptídica, podendo ser separadas por qualquer método, incluindo espaçadores.
3. USO DO ANTÍGENO PEPTÍDEO MIMÉTICO P-SC2-S118, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser usado em métodos de diagnóstico e detecção de anticorpos em amostras biológicas, incluindo sangue, soro, plasma, urina, saliva ou outro fluido corporal de pacientes com COVID-19 incluindo as diferentes formas clínicas (com ou sem sintomas).
4. USO DO ANTÍGENO, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** incluir os métodos imunoenzimáticos ELISA e Teste de avidéz.
5. USO DO ANTÍGENO P.SC2.S118 (SEQ ID N° 1), de acordo com a reivindicação 3 e 4, em método de detecção *in vitro* de infecção por SARS-CoV-2, **caracterizado por** permitir o estadiamento da doença pela pesquisa de Imunoglobulinas M, G e total, e teste de avidéz, compreendendo as seguintes etapas:

- a) ligação de anticorpos anti-SARS-CoV-2, de uma amostra biológica de paciente, ao peptídeo P-SC2-S118 (SEQ ID N° 1) ligado a um suporte sólido ou a um carreador;
 - b) contactar os anticorpos do passo (a) com um anticorpo secundário ou uma proteína, conjugados a uma enzima ou a um marcador e que se ligam aos anticorpos do passo (a);
 - c) detectar os anticorpos anti-SARS-CoV-2 na amostra biológica de pacientes pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligada ao dito anticorpo anti o vírus SARS-CoV-2.
6. USO DO ANTÍGENO P.SC2.S118 (SEQ ID NO. 1), de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pela** etapa (a) compreender os seguintes passos:
- a) Imobilização do antígeno peptídeo P-SC2-S118 a um suporte sólido ou a um carreador, na concentração 0,1 a 1,5 µg/mL;
 - b) Adição de solução tampão de bloqueio, mais especificamente BSA (*bovine serum albumin*) ou Caseína, diluída em solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4, na concentração de 2 a 5% (m/v);
 - c) Diluição da amostra de fluido biológico em solução tampão na proporção de 1:50 a 1:600 (v/v) e incubação de 40-90 min a 37°C.
7. USO DO ANTÍGENO P.SC2.S118 (SEQ ID NO. 1), de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pela** etapa (b) compreender a diluição das soluções de anticorpo secundário ou proteína conjugados com marcador ou enzima na proporção de 1:2500 a 1:25000 (v/v) em solução tampão e incubação de 40-90 min a 37 °C.
8. USO DO ANTÍGENO P.SC2.S118 (SEQ ID NO. 1), de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** uso de anticorpos secundários que

compreendem soluções aquosas de imunoglobulinas, mais especificamente, anticorpos anti-IgM, anti-IgG e anti-IgTotal, conjugadas a uma enzima ou marcador podendo as enzimas serem selecionadas do grupo consistindo de fosfatase alcalina, peroxidase, β -galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase.

9. USO DO ANTÍGENO, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pela** etapa (c) compreender:

- a) Adição de solução de substrato cromogênico, mais especificamente, solução de TMB (5,5'-tetrametilbenzidina) ou de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride), e incubação de 5-60 min;
- b) Adição de solução de parada composta de H_2SO_4 5 M, com diluição na proporção de 1:6 (v/v) do volume final da reação;
- c) Leitura de absorbância da reação.

10. USO DO ANTÍGENO, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** compreender ou não a etapa de incubação com solução desnaturante, podendo ser esta uma solução de Ureia 6 M.

FIGURAS

Figura 1

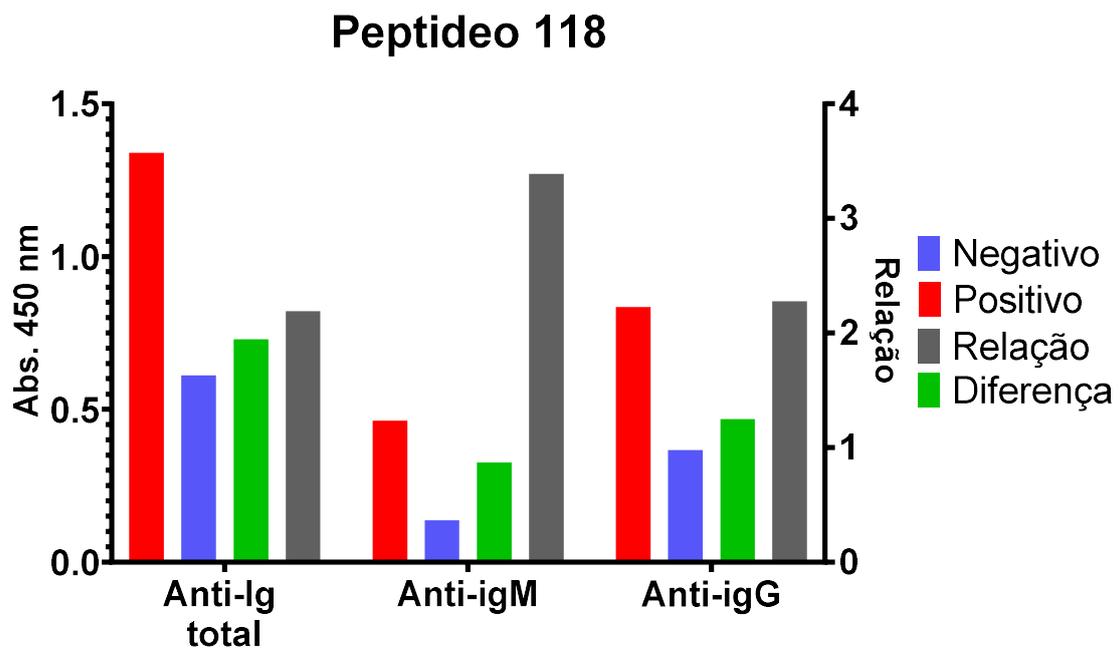
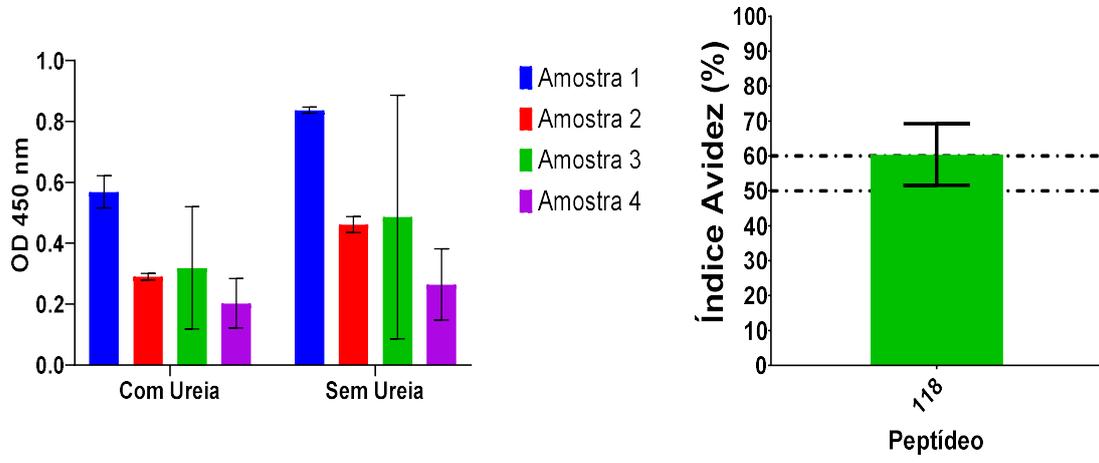


Figura 2



RESUMO**USO DE PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S118 PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19 USANDO PLATAFORMA DE IMUNODIAGNÓSTICO**

A presente invenção trata da proteção de novo antígeno peptídico sintético e seu uso em imunodiagnóstico da doença COVID-19. O P.SC2.S.118 compreende uma sequência de aminoácidos detectado pelas metodologias capazes de simular epítipo de SARS-CoV-2. Os métodos de diagnóstico que podem empregar este peptídeo são baseados na interação do antígeno com componentes de amostras biológicas e posterior revelação da interação entre estes. O novo antígeno foi sintetizado quimicamente, avaliado e validado com soro de pacientes positivos para COVID19 e controles negativos. O antígeno em questão P.SC2.S.118 (SEQ ID No. 1) detecta resposta humoral e o estágio da resposta com a identificação das diferentes imunoglobulinas (IgM, IgG e IgTotal), sendo útil ao diagnóstico da COVID-19 por técnicas imunológicas, como o ensaio imuno-enzimático (ELISA indireto), mas não se limitando a esta. O teste ELISA com o uso do novo antígeno P.SC2.S.118 apresentou um índice de avidéz de 60% e a relação entre as absorbâncias das amostras positiva e negativa está entre 2 e 4, dependendo do conjugado utilizado. O(s) método(s) e o antígeno usado na presente invenção não apresentam toxicidade, não são invasivos, tornando-se uma opção de diagnóstico mais acessível pelo baixo custo em relação aos métodos moleculares. A aplicação desta invenção está relacionada com a saúde humana e se situa no campo industrial.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Sequencia Nova.txt
- Data de Geração do Código: 03/02/2022
- Hora de Geração do Código: 17:34:16
- Código de Controle:
 - Campo 1: AC00645EAA55AAB6
 - Campo 2: D6F03B0F12613B56