



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

(21) BR 102020024378-0 A2



(22) Data do Depósito: 30/11/2020

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

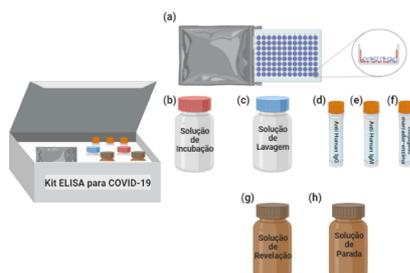
(54) **Título:** ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.309 APLICADO EM KIT E MÉTODO ELISA PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE COVID-19

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

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

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

(57) **Resumo:** ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.309 APLICADO EM KIT E MÉTODO ELISA PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE COVID-19. Frente ao panorama da pandemia de COVID-19 há a necessidade de alternativas de diagnóstico. A presente invenção descreve um kit e método diagnóstico sorológico para COVID-19. Esta utiliza como antígeno o peptídeo sintético P.SC2.S.309 em imunoenaios no formato de teste ELISA para identificar imunoglobulina IgM em amostras biológicas de humanos, podendo também ser aplicada como Teste de Avidéz. O peptídeo P.SC2.S.309 apresenta sequência artificial altamente similar ao do SARS-CoV-2 e de baixa similaridade com outros organismos próximos. Este kit e seu método de uso apresentam alta sensibilidade (85%) e especificidade (100%) para detecção de IgM. Além de ser um teste de baixo custo e fácil execução, possibilitando um teste diagnóstico eficiente mais acessível.



## **ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.309 APLICADO EM KIT E MÉTODO ELISA PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE COVID-19**

### Campo da Invenção

[001]. A presente invenção descreve um kit e método diagnóstico sorológico para COVID-19 de alta sensibilidade e especificidade. Reivindica-se a sequência de aminoácidos do antígeno P.SC2.S.309 (SEQ ID No. 1), o kit de diagnóstico sorológico que o contém e o método de uso do kit para diagnosticar COVID-19 utilizando ensaio imuno-enzimático ELISA.

[002]. A presente invenção está relacionada à área de biotecnologia. Sua novidade é o desenvolvimento do kit de diagnóstico para detecção de anticorpos contra peptídeo (antígeno) que mimetiza o vírus SARS-CoV-2 e emprega o método de ELISA indireto. Este kit inclui: microplacas revestidas com o antígeno, que é um peptídeo sintético, e solução de bloqueio; solução de lavagem; solução de incubação diluente para amostra biológica, anticorpo secundário e conjugado; solução substrato de revelação; solução de anticorpos secundários Anti-Human-IgM e Anti-Human-IgG; solução de conjugado; e solução de parada da reação.

### Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[003]. A COVID-19, *coronavirus disease 2019*, é uma doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, com material genético na forma de RNA. Este coronavírus é altamente transmissível e sua disseminação ocorre principalmente por gotículas exaladas na respiração e contato próximo. Associa-se a severidade da infecção ao desencadeamento de uma tempestade de citocinas (HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology*. 2020). Outros coronavírus capazes de

infectar humanos apresentam grande similaridade genética com o SARS-CoV-2, como o SARS-CoV e o MERS-CoV, os quais apresentam identidade de sequência de 79% e 50%, respectivamente (LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. n 395. p 565-574. 2020).

[004]. A COVID-19 foi registrada ao final de 2019 em Wuhan (China) e se tornou uma pandemia de grave ameaça à saúde pública mundial. Mundialmente, até 02 de novembro de 2020, houve cerca de 46 milhões de casos de COVID-19 e cerca de 1,2 milhões de óbitos (WHO, World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. 2020. Acesso em: 02 nov 2020. Disponível em: <https://covid19.who.int/>). No Brasil, até 01 de novembro de 2020, houve cerca de 5,5 milhões de casos confirmados e cerca de 160 mil óbitos (BRASIL, Ministério da Saúde. Painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) no Brasil. 2020. Acesso em: 02 nov 2020. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>). Demonstrando que até o momento, do total mundial, aproximadamente 12% dos casos e 13,4% dos óbitos ocorreram no Brasil.

[005]. O diagnóstico de COVID-19 é geralmente realizado pela combinação de avaliação clínica, testes laboratoriais e de imagem. O padrão ouro de teste laboratorial é o teste molecular baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) pela transcriptase reversa (RT) de forma quantitativa (q), o RT-qPCR (RU2731390C1). Imunoensaios (CN111190005A) e métodos alternativos (US2020279585A1) também podem ser utilizados indicando presença de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 (WIERSINGA, W. J.; RHODES, A.; CHENG, A. C. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clinical Review & Education*. n. 324. p. 782-793. 2020; ALEKSANDROVICH, F. M. Test system and method for detecting

RNA of coronavirus sars-cov-2, virus-agent of coronavirus disease 2019 covid-19, by polymerase chain reaction in real time (embodiments). Depositante: Obshchestvo S Ogranichennoj Otvetstvennostyu. RU2731390C1. Depósito: 11 abr. 2020. Concessão: 01 set. 2020; NIANLIN, Z. et al. Novel detection reagent card for coronavirus antibody detection and preparation method of detection reagent card. Depositante: Chongqing Isia Bio-Technology CO LTD. CN111190005A. Depósito: 22 fev. 2020; ROTHSCHILD R. System and Method for Testing for COVID-19. Depositante: ROTHSCHILD RICHARD. US2020279585A1. Depósito: 16 maio 2020).

[006]. Exames de imagem como de tomografia computadorizada são limitadas e não específicos, podendo sobrepor com características observadas em outras enfermidades (WIERSINGA, W. J.; RHODES, A.; CHENG, A. C. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Clinical Review& Education. n. 324. p. 782-793. 2020).

[007]. Testes moleculares (RU2727054C1) embora sejam o padrão ouro apresentam limitações como a disponibilidade, custo e podem apresentar resultados falso negativos. Alguns fatores que levam a falso-negativos e variabilidade da sensibilidade são o tempo de exposição, material de amostra e procedimento de coleta. A sensibilidade deste teste técnica varia conforme o tempo de coleta de amostra após início de sintomas, cerca de 62% no primeiro dia, 80% no terceiro dia e 33% no quarto dia (KUCIRKA, L.M.; LAUER, S.A.; LAEYENDECKER, O.; et al. Variation in false-negative rate of reverse transcriptase polymerase chain reaction-based SARS-CoV-2 tests by time since exposure. Annals of Internal Medicine. n. 173. p. 262-267. 2020; WIERSINGA, W. J.; RHODES, A.; CHENG, A. C. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Clinical Review& Education. n. 324. p. 782-793. 2020; FELIKSOVICH, D. S.; VALERIEVNA, P.

G.; VIKTOROVICH, G. A. Method for detecting cDNA of sars-cov-2 coronavirus using synthetic oligonucleotide primers in polymerase chain reaction. Depositante: DROZD SERGEJ FELIKSOVICH. RU2727054C1. Depósito: 23 abr. 2020. Concessão: 16 jul. 2020).

[008]. Ensaios sorológicos podem indicar o estado ativo da doença ou exposições passadas. Detecção de anticorpos IgM (CN111351941A) podem ocorrer a partir de 5 dias depois do início de sintomas, apresentando pico após 2-3 semanas. Enquanto IgG (CN111351940A) são detectados após cerca de 14 dias. As plataformas de testes sorológicos mais empregadas são do tipo point-of-care com imunocromatografia de fluxo lateral (GB202006385D0) e ensaios imunoenzimáticos com teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (WIERSINGA, W. J.; RHODES, A.; CHENG, A. C. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Clinical Review & Education. n. 324. p. 782-793. 2020; XINGSHANG, X.; LUNBIAO, C.; BIN, W.; LONG, W. Novel coronavirus IgM detection reagent, reagent card, reagent kit and preparation method thereof. Depositante: Nanjing Lanyu Biotechnology CO LTD. CN111351941A. Depósito: 22 fev. 2020; XINGSHANG, X.; LUNBIAO, C.; BIN, W.; LONG, W. Novel coronavirus IgG detection reagent, reagent card, reagent kit and preparation method thereof. Depositante: Nanjing Lanyu Biotechnology CO LTD. CN111351940A. Depósito: 22 fev. 2020; UNIV SOUTHAMPTON. Rapid point-of-care diagnostic assay for Covid-19. Depositante: UNIV SOUTHAMPTON. GB202006385D0. Depósito: 29 abr. 2020).

[009]. O teste de ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked Immunosorbent assay* ELISA), apresenta anticorpos ou antígenos imobilizados em suporte sólido e utiliza enzimas como estratégia de indicação da presença da interação antígeno-anticorpo. Gerando coloração diferencial, fluorescência (CN111366729A) ou luminescência.

Estas enzimas são conjugadas covalentemente com anticorpos específicos para espécies e classes de imunoglobulina, considerados anticorpos secundários. Um dos formatos de aplicação de testes ELISA é na forma qualitativa indireta onde o antígeno está imobilizado em suporte. Então o anticorpo primário, presente na amostra biológica, interage com o antígeno imobilizado e o anticorpo secundário conjugado interage com o anticorpo primário. Empregando solução de substrato para a enzima conjugada, esta gera o indicativo a ser observado ou mensurado. Este formato qualitativo diferencia entre grupos positivos e negativos, podendo ser aplicado para diagnóstico sorológico de COVID-19 (RU2730897C1) e distingue amostras entre grupo positivos ou negativos (WILD, D. G. (ed). *The Immunoassay Handbook*. 4 ed. Amsterdam: Elsevier, 2013; FENG, C.; ZHI, Z.; HONGBO, Y. Novel coronavirus COVID-19 antigen fluorescence detection kit and preparation method thereof. Depositante: SHENZHEN ZIJIAN BIO TECH CO LTD. CN111366729A. Depósito: 25 mar. 2020; NIKOLAEVICH, K. N. et al. Method of using recombinant proteins SARS-CoV-2 as part of a test system for ELISA test with determining IgM, IgG, IgG class antibody levels in blood serum/plasma of covid-19 patients. Depositante: Federalnoe Gosudarstvennoe Byudzhetnoe Uchrezhdenie Nauki Inst Bioorganicheskoy Khimii Im Akademikov. RU2730897C1. Depósito: 30 jun. 2020. Concessão: 25 ago. 2020).

[010]. Alguns parâmetros fundamentais para avaliar a qualidade em um teste qualitativo é a determinação do valor de ponto de corte, sensibilidade e especificidade do teste. O ponto de corte indica a faixa de valores resposta do ensaio para diferenciar a amostra entre os grupos positivo e negativo. Este valor pode ser calculado como a média de valores do grupo negativo somado a duas ou três vezes o desvio padrão deste grupo, ou utilizando a curva ROC. Uma curva ROC, *Receiver Operating Characteristic*, possibilita calcular o valor do ponto

de corte da reação, sensibilidade e especificidade de um teste (WILD, D. G. (ed). *The Immunoassay Handbook*. 4 ed. Amsterdam: Elsevier, 2013).

[011]. Outro formato de imunoenensaio por teste ELISA é o teste de avidéz. Este ensaio visa medir a força de ligação de imunoglobulinas IgG a antígenos imobilizados. Baseia-se no conceito de que a afinidade de anticorpos aumenta com o tempo após exposição ao antígeno, o que é associado a uma mudança no padrão de imunoglobulinas encontradas, de IgM para IgG. A avidéz pode ser medida realizando o teste ELISA em duas condições, com e sem algum agente desnaturante. Assim, anticorpos de baixa afinidade com o antígeno imobilizado tendem a não interagirem e resultarem em valores resposta inferiores aos obtidos na amostra sem o agente desnaturante (WILD, D. G. (ed). *The Immunoassay Handbook*. 4 ed. Amsterdam: Elsevier, 2013). O teste de avidéz além de fins para diagnóstico pode ser empregado para pesquisa na investigação de novos antígenos ou anticorpos.

[012]. Devido à similaridade entre as proteínas N e S do SARS-CoV-2 e de outros coronavírus, há uma variabilidade grande de especificidade do teste dependendo do antígeno empregado. Os antígenos mais explorados para diagnóstico sorológico para COVID-19 são as proteínas estruturais S e N (CN111239392A), incluindo seus fragmentos (LEE, C. Y.; LIN, R. T. P.; RENIA, L.; NG, L. F. P. *Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control*. *Frontiers in Immunology*. n. 879. 2020; CHUNLEI, F.; XIAOJIN, Z.; XIANGRONG, C. *Novel coronavirus pneumonia (COVID-19) serological diagnosis kit Add note*. Depositante: ZHEJIANG NEOGENE BIOTECHNOLOGY CO LTD. CN111239392A. Depósito: 25 fev. 2020).

[013]. Proteínas imunogênicas, como a S e a N do SARS-CoV-2, podem ser mapeadas quanto aos seus epítomos, identificando peptídeos de sua estrutura que apresentam potencial imunogênico.

Peptídeos são proteínas de cadeia curta de aminoácidos. Usualmente considera-se entre 50 e 100 aminoácidos o limite para ser considerado um peptídeo. Estes podem ser aplicados em imunoenaios (BR00221103624550) como o teste de ELISA ou em testes de avidéz (PI 0608768-0 B1) (WILD, D. G. (ed). The Immunoassay Handbook. 4 ed. Amsterdam: Elsevier, 2013; ALBAN, S.; MOURA, J.; THOMAZ-SOCCOL, V. Uso de peptídeos miméticos de *Mycobacterium leprae* para diagnóstico e vacina. Depositante: Universidade Federal do Paraná. BR00221103624550. Depósito: 03 maio 2011; KOSMATOPOULOS, K. Uso de um peptídeo nativo para a produção de uma composição medicinal, processo para a obtenção in vitro de ctls com elevada avidéz por um peptídeo nativo e kit de vacinação. Depositante: VAXON BIOTECH. PI 0608768-0 B1. Depósito: 09 maio 2006. Concessão: 20 ago. 2019).

[014]. Em buscas de anterioridade em bancos de documentos patentários não foram encontrados documentos publicados, reivindicando kits de imunoenaios (mais especificamente ELISA indireto) usando peptídeos sintéticos como antígeno para SARS-CoV-2. Isto corrobora com a originalidade da presente invenção, além de a mesma contar com uma sequência artificial original. Os termos de busca “(COVID\* OR SARS-CoV-2 OR coronavirus) AND (diagnos\* OR test\*) AND (peptid\*)” foram utilizados em buscas nas plataformas do INPI, Espacenet, Derwent e Patent Inspiration. Considerando publicações a partir de 2019, foram encontrados documentos requerendo peptídeos de SARS-CoV-2, porém sem comprovada aplicação direta em kit ELISA indireto (CN111393532A). Os documentos mais similares a esta proposta apresentam inovação empregando múltiplos peptídeos no mesmo teste (CN111423496A), ao invés de apenas um, ou peptídeos aplicados a outros tipos de imunoenaios (CN111647054-A), ambos alcançando sensibilidade inferior ao da invenção aqui detalhada (ZHOU, J. et al. New dominant epitope fusion

protein comprising N protein dominant epitope peptides, S dominant epitope peptides and E protein dominant epitope peptides, useful in double antibody sandwich in vitro novel coronavirus diagnostic reagent. Depositante: Beijing Diagreat Biotechnology CO LTD. CN111393532-A. Depósito: 26 fev. 2020; LINLIN, B. et al. Polypeptides or combinations thereof for detecting novel coronaviruses. Depositante: Inst Of Laboratory Animal Sciences Chinese Academy Of Medical Sciences. CN111423496B. Depósito: 14 jul. 2020. Concessão: 17 set. 2020; ZHAO, W. et al. New polypeptide useful for preparing reagents for detecting or diagnosing the novel coronavirus SARS-CoV-2. Depositante: Shanghai Xiangyao Biopharma CO LTD. CN111647054-A. Depósito: 12 jun. 2020)

#### Descrição da abordagem do problema técnico

[015]. Considerando-se o panorama da pandemia de COVID-19 é evidente a necessidade de métodos alternativos de diagnóstico que sejam eficientes e acessíveis à população. O método considerado padrão ouro, (molecular pela técnica RT-qPCR), apresenta limitações como alto custo e variabilidade de sensibilidade e de eficiência em diagnosticar o vírus em fase inicial da infecção. Os métodos sorológicos se apresentam como alternativas para diagnóstico e monitoramento da doença ou da epidemiologia da mesma.

[016]. Imunoensaios empregando a técnica ELISA são uma vertente dos métodos sorológicos. Esta técnica é amplamente empregada em laboratórios de diagnósticos para outras doenças, podendo ser de baixo custo e fácil execução. Na técnica pode-se usar peptídeos como o antígeno e peptídeos sintéticos são de rápida produção e escalabilidade, alcançando altos rendimentos no seu processo de produção.

[017]. Frente à necessidade de alternativas de diagnóstico, esta invenção apresenta um kit e seu método de uso para diagnosticar anticorpos IgM e IgG específicos para COVID-19. Nesta invenção é empregado como antígeno o peptídeo sintético P.SC2.S.309 (SEQ ID No. 1). O qual é uma sequência artificial de alta especificidade para o organismo alvo, SARS-CoV-2. Pode ser rapidamente produzido em larga escala e com a utilização de cerca de 10 a 100 ng deste peptídeo como antígeno por teste diagnóstico. Sínteses de pequena a larga escala podem variar a massa final obtida entre cerca de 1 a 480 mg de peptídeo. Tal rendimento reflete na produção de batelada de síntese em larga escala obtendo-se antígenos suficientes para grande quantidade de testes, podendo-se chegar à escala de milhões de testes.

[018]. Portanto, a presente inovação traz como novidade um teste sorológico do tipo ELISA indireto empregando peptídeos sintéticos capazes de identificar eficientemente imunoglobulinas do tipo IgM e IgG, incluindo a distinção de IgG de alta avidéz. Além de diagnóstico, o teste serve como indicativo de tempo de exposição e fase de resposta imunológica que o indivíduo se encontra.

#### Descrição detalhada da Invenção

[019]. A presente invenção descreve um kit de diagnóstico sorológico para COVID-19 e seu uso. Este kit contém como antígeno o peptídeo sintético P.SC2.S.309 (SEQ ID No. 1), uma sequência artificial engenheirada a partir das sequências de proteínas do vírus SARS-CoV-2. O uso do kit refere-se ao método de teste imuno-enzimático (ELISA), sendo capaz de detectar, a presença de anticorpos específicos contra o vírus SARS-CoV-2, em amostras biológicas, diferenciando indivíduos que foram ou não infectados. Os anticorpos identificados podem ser do tipo IgG, IgM ou Ig total (IgA, IgM, IgA e IgE). Além disso, o kit e método

aqui propostos podem ser utilizados para identificação de anticorpos IgG de alta avidéz para fins de diagnóstico ou pesquisa.

[020]. Os exemplos dados a seguir mostram a obtenção do antígeno e sua validação. Mas, não se limitando a estes, o kit de diagnóstico aqui proposto e seu uso:

Exemplo 1: Obtenção do antígeno P.SC2.S.309 para o Kit e método diagnóstico para COVID-19

[021]. A sequência de aminoácidos do peptídeo P.SC2.S.309 (SEQ ID No. 1) foi desenvolvida a partir de ferramentas de bioinformática e avaliada quanto a sua similaridade com sequências provenientes dos organismos SARS-CoV-2 (taxid:2697049), MERS (1335626), H1N1 (taxid:114727) e humanos (taxid:9606). Também, foram avaliadas comparativamente à similaridade com sequências já patenteadas. Análises apresentadas na Tabela 1 foram realizadas pela ferramenta BLASTp disponível na plataforma do NCBI, National Center for Biotechnology Information, mostrando que a identidade variou de 77,8 a 92,3% (ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 1997).

[022]. Tabela 1: Análise de similaridade da sequência artificial SEQ ID No. 1 (peptídeo P.SC2.S.309) com outros organismos e com humanos

<b>Organismo</b>	<b>Menor E-value</b>	<b>Identidade</b>	<b>Cobertura</b>
<b>SARS-CoV-2</b>	4x10 <sup>-11</sup>	100,00%	83%
<b>MERS</b>	2,2	77,78%	50%
<b>H1N1</b>	124	83,33%	33%
<b>Humanos</b>	2	87,50%	72%
<b>Patenteados</b>	1x10 <sup>-7</sup>	92,31%	72%

[023]. Baseando-se nos valores da Tabela 1 observa-se que o peptídeo P.SC2.S.309 apresenta alta similaridade com o organismo alvo, SARS-CoV-2. Porém, devido a modificações feitas na sequência natural esta apresenta uma cobertura de 83%. Portanto, trate-se de uma sequência artificial, não natural, e altamente específica. Apresentou também baixa similaridade para organismos MERS, H1N1 e para humanos, diminuindo o risco de reação cruzada com anticorpos específicos para estes outros organismos. Sequências iguais não foram encontradas na base de documentos patentários, sendo a de maior similaridade a sequência 183 do documento patentário US7491397 (Sequence ID ACP57793.1), com apenas 72% de cobertura (CHONG, P. C. S.; HSIEH, S. L. Receptor binding polypeptides. Depositante: National Health Research Institutes. US7491397. Depósito: 10 jan. 2005. Concessão: 17 fev. 2009).

[024]. Algumas características físico-químicas relevantes para o peptídeo P.SC2.S.309 foram preditas utilizando a ferramenta ProtParam-Expasy (GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M (ed). The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, 2005) e estão apresentadas na Tabela 2.

[025]. O peptídeo P.SC2.S.309, aqui reivindicado, pode ser obtido por via química ou biológica. A via biológica inclui a sua expressão em micro-organismos na forma de proteína recombinante. A via química se dá a partir de sucessivas reações gerando ligações peptídicas entre aminoácidos (da sequência) modificados.

[026]. Tabela 2: Características físico-químicas preditas para o peptídeo P.SC2.S.309.

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Massa molecular	1899,44 g/mol

Ponto Isoelétrico teórico	8,67
Fórmula química	C <sub>72</sub> H <sub>131</sub> N <sub>21</sub> O <sub>22</sub> S <sub>8</sub>
Índice GRAVY de hidrofobicidade	0,644

[027]. A síntese química de peptídeos, pela técnica de síntese de peptídeos ancorados em matriz sólida, foi utilizada para síntese do peptídeo P.SC2.S.309 (MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. Journal of the American Chemical Society, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1963). O sintetizador automatizado MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments) juntamente com aminoácidos modificados com grupos de proteção Fmoc e resina de suporte foram utilizados. Após a síntese, os peptídeos foram purificados realizando ciclos de lavagem com éter tert-butil-metil e ressuspensos em água ultrapura. Foram congelados a -80°C e liofilizados a -45° durante 24 h ou até pressão menor do que 50 mbar em equipamento liofilizador Modulyod Freeze Dryer (ThermoFischer). Por fim, ressuspensos em solução tampão fosfato-salina pH 7,0 e mantidos em -20 °C até o uso.

[028]. A solução de peptídeos foi quantificada quanto ao seu conteúdo proteico total utilizando o kit Micro BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific). A concentração calculada foi adotada como concentração dos peptídeos na solução.

Exemplo 2: Padronização da aplicação do antígeno P.SC2.S.309 em kit e método diagnóstico por teste ELISA para detecção de anticorpos IgM, IgG e Ig total

[029]. Com o peptídeo P.SC2.S.309 sintetizado e a proteína quantificada, a reatividade deste foi avaliada aplicando o teste imunoenzimático (ELISA indireto). Avaliados frente a amostras biológicas da fração soro do sangue de indivíduos diagnosticados com COVID-19

(aprovação em comitê de ética Parecer 4.080.417). Os parâmetros concentração de antígeno, tipo e concentração de solução de bloqueio, diluição de soro e de anticorpo secundário foram variados. Isto visando determinar a melhor combinação de condições para alcançar a maior razão entre valores obtidos entre soros positivos e negativos.

[030]. As concentrações de antígeno foram variadas dentro da faixa de 10 até 150 ng/poço de reação. A solução de bloqueio foi variada para duas opções de reagente, caseína (entre 2 e 4% m/v) e BSA, Bovine Serum Albumin (entre 3 e 5% m/v). A diluição de soro variou entre 1:50 e 1:250 v/v. Marcadores moleculares específicos foram utilizados como anticorpos secundários, estes foram os anticorpos anti-human IgM, IgG, e Ig total conjugados com peroxidase ou biotina. Os anticorpos secundários foram diluídos entre 1:5.000 e 1:25.000 v/v.

[031]. As etapas do método ELISA variando as condições foram as seguintes, em ordem de realização:

- a) Incubação com 50-200  $\mu$ L de solução de antígeno diluída nas diferentes concentrações, a 4°C overnight em poços de microplacas de alta aderência;
- b) Incubação com 50-200  $\mu$ L de solução de bloqueio nas diferentes concentrações e reagentes, a 37 °C durante 1 h;
- c) Incubação com 50-200  $\mu$ L de solução de soro diluída nas diferentes concentrações, a 37 °C durante 1 h. Para esta etapa avaliou-se a mesma condição utilizando como amostra mistura (pool) de soros positivos e uma amostra de soro negativa;
- d) Incubação com 50-200  $\mu$ L de solução de anticorpos secundários diluídos nas diferentes concentrações e para diferentes marcadores, a 37 °C durante 1 h;

- e) Quando avaliado anticorpos secundários conjugados com biotina realizou-se incubação com 50-200 µL de solução de neutravidina (conjugado neutravidina-peroxidase) diluída nas concentrações entre 1:7.500 e 1:15.000 v/v, a 37 °C durante 1 h;
- f) Incubação com 50-200 µL da solução cromogênica TMB (tetrametilbenzidina) a temperatura ambiente durante 30 min, ao abrigo da luz;
- g) Adição de 10-100 µL da solução de parada (HCl 5N);
- h) Leitura de absorbância no comprimento de 450 nm.

[032]. Entre as etapas 'a' até 'f' realizaram-se em cada poço 2 a 6 lavagens com cerca de 200 µL de solução salina contendo Tween 20 e secas por inversão em papel absorvente antes da próxima incubação.

[033]. Os valores de absorbância (ABS) obtidos nas diferentes condições para os soros negativo e positivo foram utilizadas para determinar as melhores condições para identificação de cada imunoglobulina: IgG, IgM e Ig total. A Tabela 3 apresenta os melhores valores de absorbância, diferença e razão obtidos dentro das faixas de condições avaliadas entre valores para soros positivos e soros negativos.

[034]. Tabela 3: Valores de absorbância (ABS) obtidos para identificação de diferentes tipos de imunoglobulinas utilizando o peptídeo P.SC2.S.309 em método ELISA.

	<b>IgM</b>	<b>IgG</b>	<b>Ig Total</b>
Valor de ABS (soro positivo)	2,023	0,249	1,589
Valor de ABS (soro negativo)	0,639	0,090	0,645
Diferença entre positivo e negativo	1,384	0,159	0,944
Razão entre positivo e negativo	3,166	2,767	2,464

Exemplo 3: Reatividade do antígeno P.SC2.S.309 em kit e método diagnóstico por teste ELISA para determinação de Índice de Avidéz em amostras.

[035]. Visando identificar a presença de anticorpos IgG de alta ou baixa avidéz nas amostras, realizou-se o teste ELISA variando a presença ou não de etapa com incubação de solução desnaturante, podendo ser ureia 6% M, ou outros reagentes caotrópicos como tiocianato de guanidina. O valor de porcentagem entre os valores de absorbância do ensaio com a etapa de incubação com ureia e valores da etapa sem incubação determinou o Índice de Avidéz dos anticorpos em cada amostra (Tabela 4). Frente a um painel de sete soros positivos para COVID-19 encontrou-se uma faixa de índice de avidéz entre 71,4 a 96,9%, considerados como alta avidéz (maior que 60%). Média e baixa avidéz seriam entre 50-60% e menor que 50%, respectivamente. Para os soros avaliados infere-se que por se tratarem de anticorpos de alta avidéz, os indivíduos foram expostos ao patógeno não recentemente.

[036]. Tabela 4: Valores de Índice de Avidéz para diferentes amostras utilizando o peptídeo P.SC2.S.309 em método ELISA.

<b>Amostra</b>	<b>ABS sem ureia</b>	<b>ABS com ureia</b>	<b>Índice Avidéz (%)</b>	<b>Classificação</b>
<b>1</b>	0,799±0,041	0,596±0,03	74,5	Alta
<b>2</b>	0,849	0,823±0,011	96,9	Alta
<b>3</b>	0,462±0,011	0,337±0,02	72,9	Alta
<b>4</b>	0,449±0,025	0,404±0,052	90,0	Alta
<b>5</b>	0,583±0,006	0,452	77,6	Alta
<b>6</b>	0,473±0,049	0,338±0,022	71,4	Alta
<b>7</b>	0,768±0,041	0,570±0,05	74,2	Alta

Exemplo 4: Determinação de sensibilidade e especificidade do kit e método por teste ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG.

[037]. As faixas de condições ideais foram utilizadas para avaliar individualmente um painel de 54 soros, 17 positivos e 37 negativos. Assim calculou-se a curva ROC (Figura 2) com intervalo de confiança de 95% a partir dos valores de absorbância. Determinou-se os valores de ponto de corte da reação diferenciando amostras entre positivo e negativo, a sensibilidade e especificidade alcançada, a área abaixo da curva (AUC) e o Índice Youden (Tabela 5). As distribuições de valores de absorbância para soros positivos e negativos, para IgM e IgG, estão apresentadas na Figura 4.

[038]. O teste foi capaz de diferenciar amostras positivas e negativas para IgG e IgM identificando valores acima ou abaixo da faixa de corte. Para detecção de IgM apresentou valores acentuados de sensibilidade, especificidade, AUC e índice Youden, indicando pouca chance de resultados falso-positivo ou falso-negativo.

[039]. Tabela 5: Valores de sensibilidade e especificidade para identificação de diferentes tipos de imunoglobulinas utilizando o peptídeo P.SC2.S.309 em método ELISA.

<b>Imunoglobulina</b>	<b>IgM</b>	<b>IgG</b>
Faixa de corte	0,320-0,332	0,367-0,408
Sensibilidade	84,62%	56,25%
Especificidade	100%	100%
AUC	0,943	0,834
Índice Youden	0,8462	0,5625

Exemplo 5: Preparo do kit de teste diagnóstico sorológico de COVID-19 aplicando o antígeno peptídeo sintético P.SC2.S.309.

[040]. A confecção do kit de diagnóstico para COVID-19, aqui proposto, compõe as etapas de preparo e envase de reagentes, produção do antígeno, sensibilização da microplaca, embalagem e armazenamento.

[041]. Os reagentes incluídos no kit são:

- a) Solução de lavagem: solução aquosa concentrada (entre 5 e 15x), composta de NaCl em concentração entre 7,2 e 10,8% (m/v) e Tween 20 em concentração entre 0,4 e 0,6% (m/v), acondicionada em frasco plástico opaco de 50 mL. Reagentes NaCl e Tween 20 obtidos comercialmente e diluídos em água destilada;
- b) Solução de incubação diluente: solução aquosa concentrada entre (5 e 15x), composta de caseína em concentração entre 1,6 e 4,4% (m/v) em solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4, acondicionada em frasco plástico opaco de 50 mL. Reagente caseína, obtido comercialmente e diluído em água destilada;
- c) Solução de anticorpo secundário Anti-IgM: solução aquosa concentrada de imunoglobulinas anti-human-IgM conjugadas a biotina, acondicionada em frasco plástico opaco de 2 mL. Imunoglobulinas obtidas comercialmente e diluídas com água ultra-pura;
- d) Solução de anticorpo secundário Anti-IgG: solução aquosa concentrada de imunoglobulinas anti-human-IgG conjugadas a biotina, acondicionada em frasco plástico opaco de 2 mL. Imunoglobulinas obtidas comercialmente e diluídas com água ultra-pura;
- e) Solução de conjugado: solução aquosa concentrada de neutravidina conjugada a peroxidase, acondicionada em

frasco plástico opaco de 2 mL. Conjugado obtido comercialmente e diluído com água ultra-pura;

- f) Solução substrato de revelação: solução de substrato cromogênico TMB (5,5'-tetrametilbenzidina), acondicionada em frasco plástico escuro de 50 mL. Solução obtida comercialmente;
- g) Solução de parada da reação: solução aquosa composta de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 M, acondicionada em frasco plástico escuro de 50 mL. Reagente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> obtido comercialmente e diluído com água destilada.

[042]. O antígeno pode ser obtido por expressão biológica ou síntese química, descrito no Exemplo 1. Para produção dos kits utiliza-se peptídeos sintetizados em equipamento automatizado. Aminoácidos utilizados são modificados com grupos de proteção em na cadeia lateral e grupo Fmoc no terminal N. Todos os reagentes utilizados são de grau para cromatografia com pureza maior do que 99%. São realizados 17 ciclos de ligação, um para cada aminoácido do peptídeo adicionado. Após esta etapa, os peptídeos são clivados da resina suporte e seus grupos funcionais de proteção removidos utilizando solução de TFA (ácido trifluoroacético, 92,5%), β-mercaptoetanol (2,5%), Tri-isopropil Silano (2,5%) e água ultra-pura (2,5%) sob agitação durante 4 h.

[043]. Os peptídeos clivados são filtrados para separação da resina clivada. A solução de peptídeos é diluída (1:20 v/v) em solvente éter tert-butil-metil e incubado a -20°C overnight. Em seguida são realizadas duas etapas de lavagem com o mesmo solvente, onde a solução é centrifugada (30 min, 4000 rpm) e ressuspendida. Os peptídeos precipitados na última etapa de lavagem são ressuspendidos em água ultrapura e congelados a -80 °C overnight. Segue-se para etapa de liofilização a temperaturas menores que -40°C e pressão

negativa de cerca de 83 mbar durante 24 h. São mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  liofilizados em frascos lacrados ou ressuspensos em solução tampão fosfato-salina pH 7,0. Peptídeos ressuspensos são esterilizados por filtração em membrana de poro  $0,22\ \mu\text{m}$  em cabine de segurança biológico com fluxo laminar (Classe II B2). A solução é quantificada quanto ao seu conteúdo proteico total utilizando o método BCA (ácido bicinchonínico). A concentração de peptídeos é ajustada dentro da faixa de  $0,1-1,5\ \mu\text{g/mL}$  com solução de revestimento (solução tampão carbonato pH 9,0).

[044]. Em cabine de segurança biológica com fluxo laminar (Classe II B2) são adicionados  $100\ \mu\text{L}$  de solução de peptídeos ( $0,1-1,5\ \mu\text{g/mL}$ ) em cada poço de microplacas de 96 poços de fundo reto claro de alta aderência. Após incubação a  $4^{\circ}\text{C}$  overnight (cerca de 18 h) são realizadas duas a seis lavagens com  $50$  a  $250\ \mu\text{L}$  de solução de lavagem 1x. São adicionados aos poços  $120\ \mu\text{L}$  de solução de bloqueio (BSA 3-5% m/v) e as microplacas incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. Duas a seis lavagens são realizadas com  $50$  a  $250\ \mu\text{L}$  de solução de lavagem (diluído 1x). As microplacas são seladas, com filme e, embalada a vácuo em sacos laminados metalizados.

[045]. A embalagem secundária compreende uma caixa contendo todos os reagentes do kit e a microplaca sensibilizada. Podendo ser esta de material plástico, papel ou combinação destes. Cada frasco de reagente e a microplaca sensibilizada são acondicionados de forma a ficarem fixos no interior da embalagem. Uma embalagem terciária é aplicada, esta sendo uma camada fina de plástico transparente envolvendo a caixa (embalagem secundária). O kit montado é mantido a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

#### Descrição das Figuras:

[046]. Figura 1 - Componentes do kit ELISA contendo o antígeno P.SC2.S.309 para diagnóstico de COVID-19. Itens: (a) placa de 96 poços pré-tratada com o novo antígeno e solução de bloqueio fixados em cada poço; frascos de (b) solução tampão de incubação e (c) solução tampão de lavagem; frascos microtubos de solução de (d) anticorpo secundário anti-human-IgG (d) e anticorpo secundário anti-human-IgM (e); frascos microtubos de solução (f) conjugado marcador-enzima; e frascos de solução (g) de revelação e (h) de parada.

[047].Figura 2 - Fluxograma demonstrativo de etapas de uso do kit e método ELISA para diagnóstico de COVID-19 proposto nesta invenção.

[048].Figura 3 – Curva ROC avaliando painel de soros e determinação de sensibilidade e especificidade. Avaliada com intervalo de confiança de 95%. Identificação de imunoglobulinas (a) IgM e (b) IgG.

[049].Figura 4 – Distribuição da reatividade humoral frente a soros de indivíduos positivos e negativos para COVID-19. Aplicação para identificação de amostras positivas e negativas para anticorpos (a) IgM e (b) IgG.

## **REIVINDICAÇÕES**

1. NOVO ANTIGENO PARA DIAGNOSTICO DA COVID19, PEPTÍDEO P.SC2.S.309 consistindo de sequência de amino ácidos SEQ ID: N° 1, produzida por via sintética ou recombinante, para uso em ensaios imunológicos;
2. KIT ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19 UTILIZANDO NOVO ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.309 caracterizado por: novo antígeno P.SC2.S.309 (SEQ ID: N° 1); solução de bloqueio; solução de lavagem; solução de incubação; soluções de anticorpos secundários ou de proteína(s) conjugados a uma enzima ou marcador; solução de revelação; e solução de parada;
3. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por usar suporte sólido para depósito do antígeno P.SC2.S.309, com materiais nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno ou poliestireno;
4. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizado por conter novo peptídeo sintético P.SC2.S.309 de sequência de aminoácidos SEQ ID N°. 1, em concentrações de 10 a 150 ng;
5. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizado por utilizar solução tampão de bloqueio composto de albumina, mais especificamente BSA (*bovineserumalbumin*), diluída em solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4, na concentração de 3 a 5% (m/v), ligada a um suporte sólido ou acondicionada em frasco próprio;
6. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizado pela solução tampão de lavagem ser uma solução aquosa concentrada (5 e 15x), composta de NaCl na concentração de 7,2 a 10,8% (m/v) e Tween 20 em concentração de 0,4 a 0,6% (m/v);
7. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela solução tampão de incubação compreender uma solução aquosa

concentrada (5 e 15x), composta de caseína em concentração de 1,6 e 4,4% (m/v) em solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4;

8. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por uso de anticorpos secundários, em soluções aquosas de imunoglobulinas como anticorpos anti-IgG e anti-IgM, conjugadas a uma enzima ou marcador;

9. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela(s) proteína(s) conjugada(s) a uma enzima ou marcador em soluções aquosas de proteínas A ou G, conjugadas a uma enzima ou marcador.

10. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 9 sendo a enzima conjugada a uma enzima peroxidase HRP (*horseradish peroxidase*);

11. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 9 sendo o radioisótopo a biotina, um cromóforo, um fluoróforo ou uma substância quimioluminescente;

12. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por conter neutravidina, estreptavidina ou avidina, apresentando afinidade ao marcador, conjugada a uma enzima atuando como indicativo da reação;

13. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela solução de revelação serum substrato cromogênico, como a solução de TMB (5,5'-tetrametilbenzidina) ou de OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*);

14. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela solução de parada compreendendo solução composta de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 M;

15. MÉTODO ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19 UTILIZANDO NOVO ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.309 o qual emprega kit de acordo com reivindicação 1 a 14, caracterizado pelas etapas de:

a) ligação de anticorpos anti-SARS-CoV-2 de uma amostra de fluido biológico como sangue, soro, plasma, saliva, urina ou lágrima, a

um peptídeo ou polipeptídeos caracterizados pela sequência de aminoácido do antígeno P.SC2.S.309 (SEQ ID: N<sup>o</sup>. 1), ligadas a um suporte sólido;

b) contato dos anticorpos do passo (a) com um anticorpo secundário ou uma proteína, conjugado(a) a uma enzima ou a um marcador e que se ligam aos anticorpos do passo (a);

c) detecção dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 ou não na amostra supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligados ao dito anticorpo anti-SARS-CoV-19.

16. MÉTODO ELISA de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pela etapa (a) ter os seguintes passos:

a) diluição da amostra de fluido biológico em solução tampão de incubação 1x na proporção de 1:50 a 1:400 (v/v);

b) aplicação de 50 a 200 µL da amostra diluída em cada poço do suporte sólido e incubação de 40-90 min a 37 °C;

c) lavagem de 2 a 6 vezes dos poços do suporte sólido com 50 a 250 µL de solução de lavagem 1x;

d) diluição das soluções de anticorpo secundário ou proteína conjugados com marcador ou enzima na proporção de 1:7500 a 1:15000 (v/v) em solução tampão de incubação 1x;

e) aplicação de 50 a 200 µL da solução diluída em cada poço do suporte sólido e incubação de 40-90 min a 37°C;

f) lavagem de 2 a 6 vezes dos poços do suporte sólido com 50 a 250 µL de solução de lavagem 1x;

g) Aplicação de 50 a 200 µL da solução de revelação em cada poço do suporte sólido e incubar durante 5-60 min;

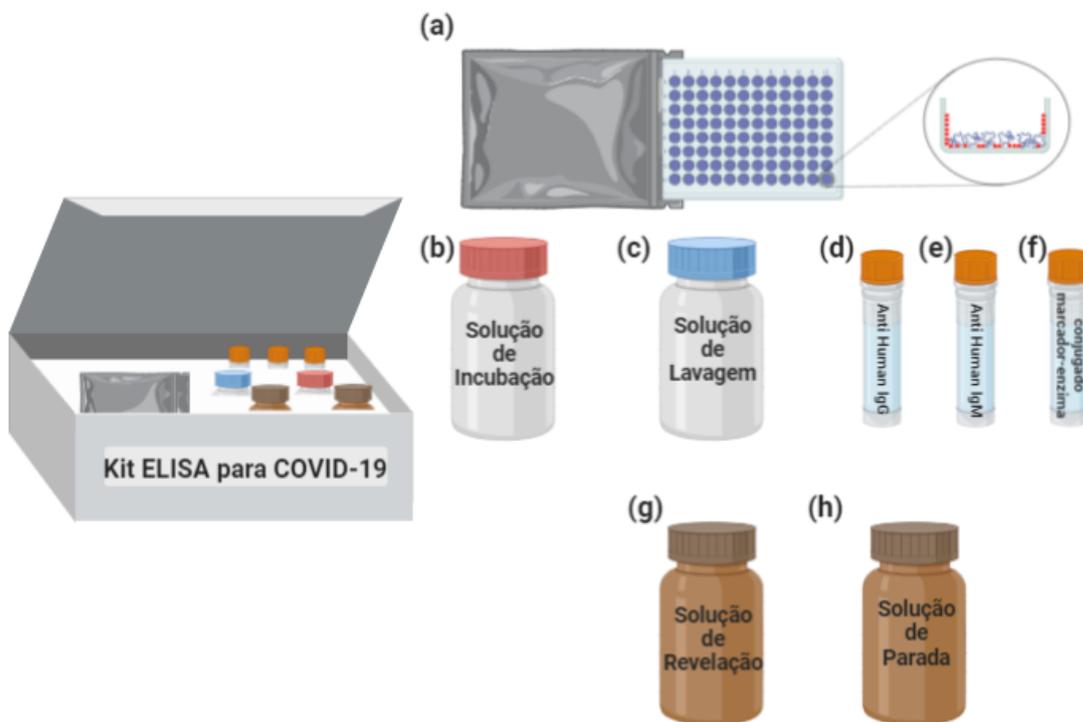
h) Aplicação de 5 a 50 µL da solução de parada na reação com diluição na proporção de 1:20 (v/v) do volume da reação;

i) Leitura de absorbância de cada poço do suporte sólido.

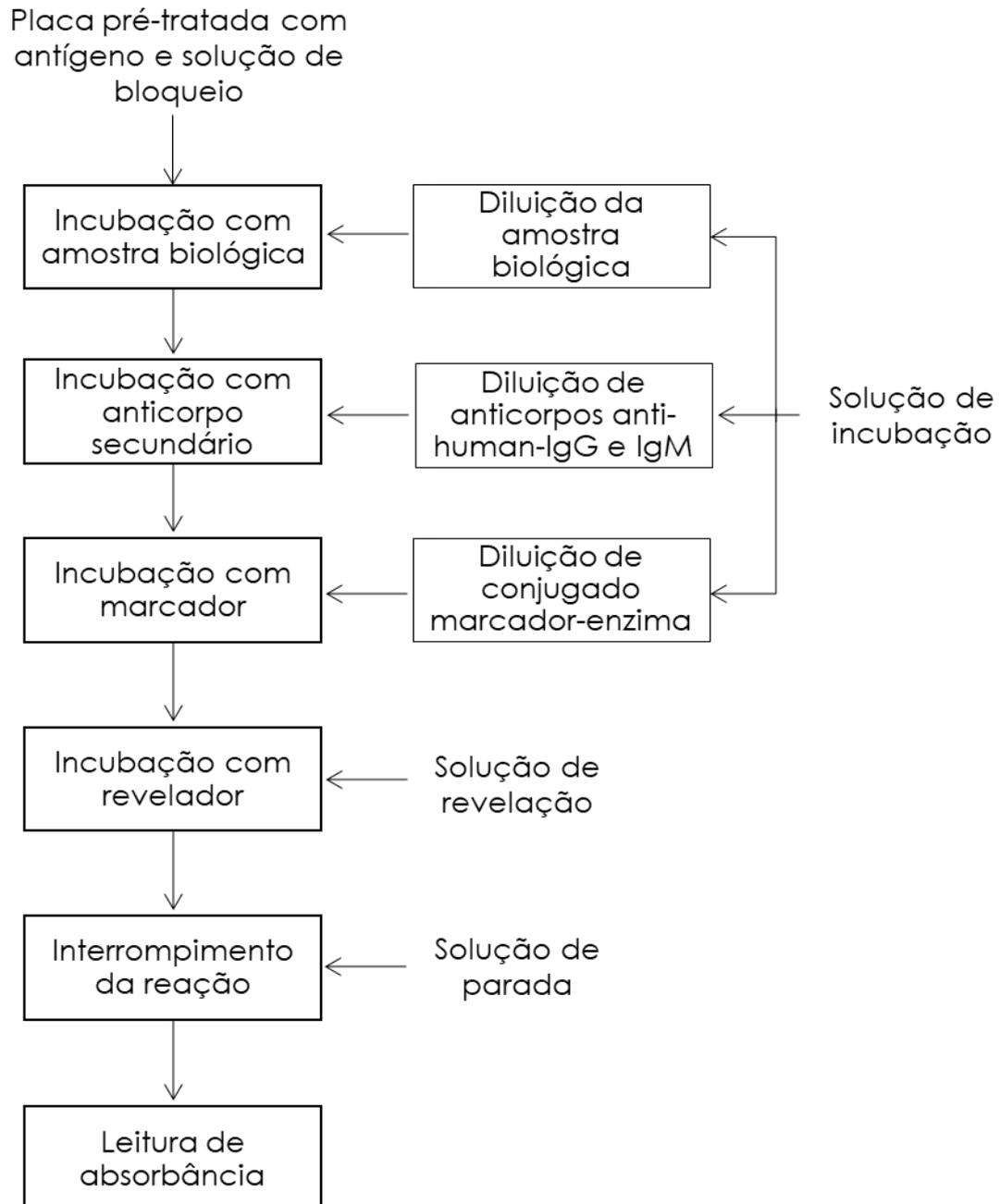
## ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.309 APLICADO EM KIT E MÉTODO ELISA PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE COVID-19

### FIGURAS

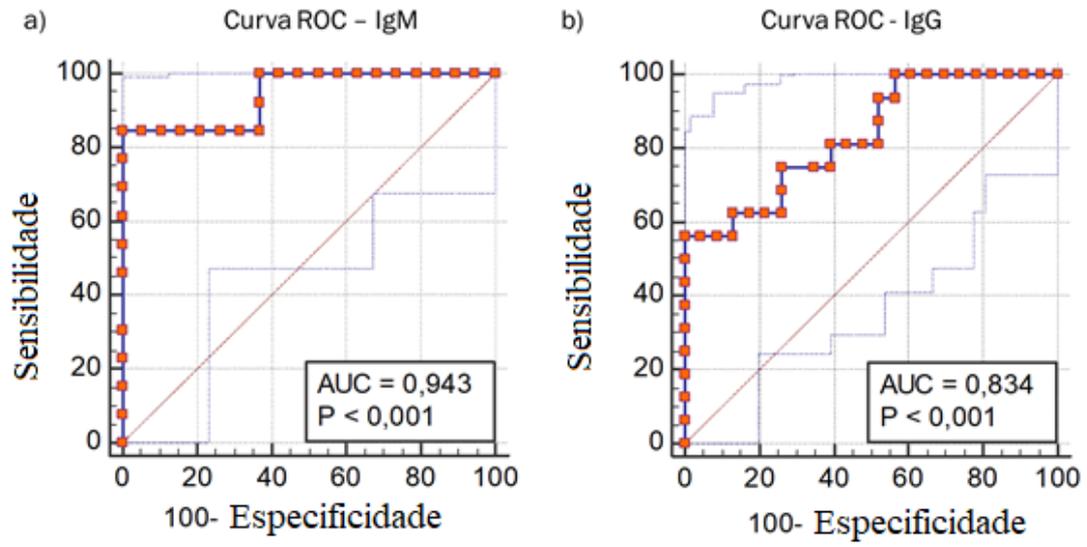
a) Figura 1:



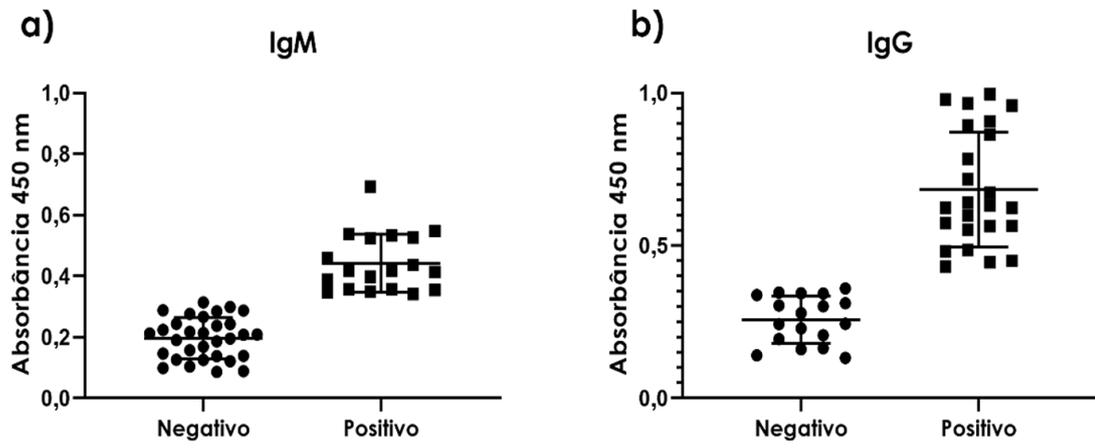
b) Figura 2:



c) Figura 3:



d) Figura 4:



**RESUMO****ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.309 APLICADO EM KIT E MÉTODO  
ELISA PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE COVID-19**

ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO P.SC2.S.309 APLICADO EM KIT E MÉTODO ELISA PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE COVID-19. Frente ao panorama da pandemia de COVID-19 há a necessidade de alternativas de diagnóstico. A presente invenção descreve um kit e método diagnóstico sorológico para COVID-19. Esta utiliza como antígeno o peptídeo sintético P.SC2.S.309 em imunoenaios no formato de teste ELISA para identificar imunoglobulina IgM em amostras biológicas de humanos, podendo também ser aplicada como Teste de Aidez. O peptídeo P.SC2.S.309 apresenta sequência artificial altamente similar ao do SARS-CoV-2 e de baixa similaridade com outros organismos próximos. Este kit e seu método de uso apresentam alta sensibilidade (85%) e especificidade (100%) para detecção de IgM. Além de ser um teste de baixo custo e fácil execução, possibilitando um teste diagnóstico eficiente mais acessível.

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: 17:38:35
- Código de Controle:
  - Campo 1: 65E9B9BE832ECC7A
  - Campo 2: 0CD2B1FC8D9EEF2A