



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102021007058-7

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102021007058-7

(22) Data do Depósito: 14/04/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 23/11/2021

(51) Classificação Internacional: C07K 14/165; G01N 33/569; A61K 39/215; A61P 31/14.

(54) Título: DIAGNÓSTICO DA COVID-19 UTILIZANDO ANTÍGENO PEPTÍDICO SINTÉTICO PROVENIENTE DA PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2º ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira; IMUNOVA ANÁLISES BIOLÓGICAS LTDA, Pessoa Jurídica. CGC/CPF: 13933224000106. Endereço: RUA IMACULADA CONCEIÇÃO, 1430, TECNOPARQUE, BLOCO 2 - PRADO VELHO, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80215-182, Brasileira

(72) Inventor: CARLOS RICARDO SOCCOL; JEAN MICHEL DELA VEDOVA COSTA; MANUEL HOSPINAL SANTIANI; VANETE THOMAZ SOCCOL; BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO; MAX INGBERMAN.

Código de Controle: C1404144E1D88203 F2B09CDC0B82A613

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 14/04/2021, observadas as condições legais

Expedida em: 09/08/2022

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



DIAGNÓSTICO DA COVID-19 UTILIZANDO ANTÍGENO PEPTÍDICO SINTÉTICO PROVENIENTE DA PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção trata de um novo antígeno peptídico sintético imunorreativo contra anticorpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 presentes em amostras biológicas. Trata também de um teste ELISA indireto para diagnóstico da COVID-19 utilizando como antígeno o peptídeo P.SC2.N.366. O teste permite discriminar eficientemente indivíduos que foram infectados pelo vírus SARS-CoV-2 (tanto para casos sintomáticos quanto assintomáticos da doença), dos que não foram infectados.

[002]. Além disso, a presente invenção trata de um kit de diagnóstico para COVID-19. O kit é caracterizado por conter microplaca revestida com o antígeno P.SC2.N.366, solução de lavagem, diluente de amostra, diluente do conjugado, solução de anticorpos secundários, solução substrato de revelação, solução de parada da reação e os controles positivo e negativo.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[003]. O vírus da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) é o sétimo vírus da família dos coronavírus (CoV) que pode infectar humanos, causando a doença denominada COVID-19. Os outros membros desta família são HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, SARS-CoV e MERS-CoV. Estes vírus infectam também outras espécies de vertebrados, como morcegos e animais de companhia. Os animais infectados podem servir de reservatórios para o vírus, que passa a infectar seres humanos através do ciclo zoonótico. O comportamento, patogênese e etiologia do SARS-CoV-2, também

chamado de novo coronavírus, são diferentes dos coronavírus epidêmicos anteriores. Porém, as características de outros coronavírus conhecidos, principalmente do SARS-CoV, fornecem uma base útil para a pesquisa relacionada ao SARS-CoV-2 (OF THE INTERNATIONAL, Coronaviridae Study Group et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, v. 5, n. 4, p. 536, 2020).

[004]. O SARS-CoV-2 tem diâmetro entre 80-120 nm, e apresenta RNA de fita positiva como material genético. O RNA viral pode ser diretamente traduzido em proteína, ou pode ser usado como molde para sintetizar novas cópias de RNA utilizando uma enzima polimerase dependente de RNA. Este mecanismo contribui para uma alta taxa de mutação do material genético viral. O comprimento total do genoma é de 26 a 32 kb, sendo o maior entre todos os vírus de RNA documentados até o momento. A região ORF1ab corresponde a dois terços do genoma, e é responsável por codificar a poliproteína ORF1ab, que tem papel na replicação do material genético viral. O outro um terço do genoma é composto por genes que codificam quatro proteínas estruturais e pelo menos seis proteínas acessórias (3a, 6, 7a, 7b, 8 e 10). As proteínas estruturais são: a proteína spike (S), a proteína de envelope (E), a glicoproteína de membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (KIM, Dongwan et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell*, 2020).

[005]. A infecção viral causada pelo novo coronavírus tem como alvo principal o sistema respiratório de humanos. As manifestações clínicas mais comuns da doença são febre, fraqueza e tosse seca, e algumas manifestações mais raras são a obstrução nasal, rinorreia e diarreia. A maioria dos casos geram infecções leves (80%), e com um período de recuperação normal de duas semanas. Todavia, os casos

graves de infecção progridem para pneumonia, choque séptico, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), acidose metabólica refratária e disfunção de coagulação, sendo potencialmente fatal (GUAN, Wei-jie et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England journal of medicine*, v. 382, n. 18, p. 1708-1720, 2020).

[006]. Os primeiros casos da COVID-19 surgiram no final de 2019 na China, e se espalharam rapidamente pelo mundo. A transmissão da doença entre humanos ocorre por meio do contato próximo com um indivíduo infectado, que produz gotículas respiratórias ao tossir ou espirrar, da mesma maneira que ocorre com o resfriado e a gripe comum. Em 11 de Março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu o status de pandemia da COVID-19. Até 20 de Janeiro de 2021, foram confirmados mais de 94,1 milhões de casos no mundo e mais de 8,5 milhões de casos no Brasil. Dentre estes, foram reportados mais de dois milhões de óbitos no mundo e 211 mil no Brasil (WHO, World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. 2020. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em 20/01/2021; BRASIL. COVID-19: Painel Coronavírus. Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>, acesso em 20/01/2021).

[007]. A prevenção e o controle da COVID-19 se tornaram tarefa comum para governos e pessoas de todos os países, que tiveram que se adaptar à presença do vírus. Dentre as medidas para controle da doença está a identificação de casos ativos. A identificação de indivíduos infectados, com ou sem sintomas, permite o seu isolamento precoce. Desta maneira, evita-se maior disseminação do vírus, e conseqüentemente se reduz o número de casos e mortes. Neste sentido, kits e testes de diagnóstico tornaram-se ferramentas indispensáveis para

a prevenção e controle da pandemia (PEELING, Rosanna W. et al. Serology testing in the COVID-19 pandemic response. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020).

[008]. Os kits de diagnóstico em uso atualmente são classificados em dois tipos de acordo com o alvo de detecção, o primeiro detecta ácido nucléico viral (RT-qPCR) e o outro detecta anticorpos anti-SARS-CoV-2. A transcrição reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é o teste laboratorial para detecção da presença do material genético viral. Este método apresenta alta sensibilidade. Porém, podem apresentar resultados falsos negativos por fatores como: 1) a coleta de amostra realizada de maneira incorreta, 2) a variação das sequências virais de RNA, 3) a variação da quantidade de carga viral ao decorrer da infecção e em diferentes locais anatômicos dos infectados. Além disso, o RT-qPCR requer equipamentos complexos, operadores treinados, garantia de qualidade laboratorial de alto padrão, e leva mais tempo para fornecer o resultado (WANG, Yishan et al. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *Journal of medical virology*, v. 92, n. 6, p. 538-539, 2020).

[009]. O segundo método visa à detecção de anticorpos contra o coronavírus por testes sorológicos. Estes ensaios são utilizados para medir as respostas de anticorpos contra os patógenos em fluidos corporais como soro, plasma sanguíneo, saliva, urina, entre outros. Eles são baseados na interação entre antígeno e anticorpo, e podem ser aplicados em diferentes plataformas: ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISAs), ensaios de fluxo lateral (lateral flow) ou ensaios de quimiluminescência, imunoeletróquímica. O sistema imunológico produz ao longo da infecção diferentes imunoglobulinas. Imunoglobulinas IgM

são produzidas mais cedo, e aparecem dentro de uma semana após a infecção. Deste modo, a presença destes anticorpos é um indicador de infecção aguda. Por outro lado, imunoglobulinas IgG são produzidas mais tarde, mas se mantêm por um período de tempo mais longo, indicando infecção ativa e infecção passada (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology. ed. 9. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2017).

[010]. Ensaios sorológicos são ferramentas essenciais no manejo de doenças infecciosas. Elas permitem a detecção de anticorpos na presença da doença ou anticorpos protetores após a vacinação. Além disso, é possível fazer avaliação da soroprevalência em uma população. A detecção de anticorpos é possível em amostras biológicas como soros, sangue, saliva, urina, lágrimas entre outras. Tem a vantagem de usar técnicas in vitro que são fáceis de operar e permitem emitir resultados em poucas horas. Para isso são usadas metodologias como o teste ELISA, Imunocromatografia, western blot, mas não se limitando a estas (KRAMMER, Florian; SIMON, Viviana. Serology assays to manage COVID-19. Science, v. 368, n. 6495, p. 1060-1061, 2020).

[011]. Os ensaios ELISA são realizados com antígenos sintéticos ou recombinantes, que são responsáveis pela ligação com os anticorpos. Portanto, a precisão do teste depende diretamente da seleção dos melhores antígenos. As duas principais proteínas virais, utilizadas como antígenos, são: a proteína spike (S) e a proteína do nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 (N). A proteína S está presente na superfície do SARS-CoV-2, e tem função de ligação do vírus aos receptores de membrana da célula hospedeira. Desta maneira, desempenha um papel importante na patogênese e pode estimular a resposta imune gerando anticorpos.

[012]. A proteína N funciona principalmente em combinação com o RNA viral e está intimamente relacionada à patogenicidade. Pode

estar envolvida na transcrição e replicação do RNA, ter funções relacionadas à mecanismos patogênicos, além de outras funções biológicas. Ademais, as proteínas do nucleocapsídeo do coronavírus são relativamente conservadas, e são muito antigênicas, então induzem a imunidade do hospedeiro para gerar altas taxas de anticorpos. Por esta razão, a proteína N de SARS-CoV-2 é uma ótima opção para ser usada como antígeno para diagnóstico de coronavírus e no desenvolvimento de vacinas (ZENG, Weihong et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. Biochemical and biophysical research communications, v. 527, n. 3, p. 618-623, 2020).

[013]. Quando as proteínas virais são produzidas de maneira recombinante, sua expressão na estrutura correta é geralmente a etapa mais difícil. Além disso, as proteínas virais costumam ter vários locais de glicosilação, o que aumenta a dificuldade de expressá-las e purificá-las. Portanto, existe um custo alto associado a sua produção e armazenamento. Além disso, ao utilizar a proteína completa como antígeno, existe a possibilidade de reconhecimento cruzado de outros anticorpos inespecíficos, o que diminui a especificidade do teste de diagnóstico.

[014]. Sendo assim, a sequência da proteína N de SARS-CoV-2 pode ser utilizada como modelo para desenvolvimento de peptídeos sintéticos com função central parcial. Os peptídeos são fragmentos da proteína completa, compostos por regiões antigênicas chave, o que possibilita aumentar a especificidade sem diminuir a sensibilidade do teste. Isto ocorre, pois a especificidade de um anticorpo é dirigida a um único epítipo antigênico, em vez da molécula antigênica inteira. Ademais, os peptídeos não dependem de conformação tridimensional, o que resolve os problemas de expressão e purificação da proteína. Portanto, os peptídeos sintéticos são uma alternativa segura e

conveniente para serem utilizados como substratos para imunoensaios e vacinas (GOMARA, M. J.; HARO, I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 5, p. 531-546, 2007).

[015]. Outro fator importante é a avaliação da avidéz dos anticorpos IgG. O índice avidéz tem sido amplamente utilizado em testes imunoenzimáticos para discriminar entre infecções ativas, infecções primárias ou secundárias. A avidéz refere-se à força de ligação resultante de todas as interações entre o antígeno e o anticorpo. 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 é uma ferramenta eficaz no diagnóstico temporal de diversas doenças infecciosas. O teste de avidéz também pode ser utilizado para análise de reações cruzadas, estudos epidemiológicos e como controle de programas de vacinação (LIU, Tiancheng et al. High-Accuracy Multiplexed SARS-CoV-2 Antibody Assay with Avidity and Saliva Capability on a Nano-Plasmonic Platform. *bioRxiv*, 2020; BAUER, Georg. The variability of the serological response to SARS-CoV-2: Potential resolution of ambiguity through determination of avidity (functional affinity). *Journal of Medical Virology*, v. 93, n. 1, p. 311-322, 2021).

[016]. Durante a pandemia de coronavírus vivida em 2020 e 2021, a demanda por insumos, equipamentos e tecnologias da área da saúde cresceram em todo o globo. Esta disputa internacional pela compra de itens essenciais levou ao aumento de preços e até a falta de itens para atender toda a demanda. O Brasil ficou sujeito às variações de preços do mercado internacional e também ficou

dependente dos países detentores das mercadorias. Por esta razão, são necessários grandes esforços para prover soluções tecnológicas nacionais, que permitam o combate à pandemia de COVID-19, bem como garantir maior autonomia do país em relação aos itens importados.

[017]. A presente invenção trata de um novo antígeno um peptídeo sintético mimético e um método de diagnóstico sorológico (ELISA indireto) para COVID-19. O peptídeo é de sequência artificial, imunorreativo com soros de indivíduos infectados com SARS-CoV-2.

[018]. Até o presente momento, poucas soluções tecnológicas foram publicadas em documentos patentários, tendo em vista que a COVID-19 foi identificada em humanos no final de 2019. Algumas soluções tecnológicas tratam de testes RT-qPCR para diagnóstico de COVID-19, como: CN111518960A, CN111074005A, CN111118228A, CN111118228B, CN111197112A, RU2731390C1.

[019]. Outras tratam de testes do tipo imunocromatografia, como: CN111024954A, CN111239400A, CN111060691A, CN111426830A, DE202020102077U1.

[020]. Entretanto, algumas invenções descrevem o uso de proteínas recombinantes como antígeno para testes do tipo ELISA. A proteína S é utilizada nas patentes CN111983226A, US8541003B2 e US2016376321A. Já a proteína N é utilizada nas patentes CN111983226A e CN111647055A.

[021]. Alguns trabalhos exploram peptídeos para diagnóstico de COVID-19, como CN111856027A e CN111978378A. Contudo, nestes trabalhos foram utilizadas combinações de diferentes peptídeos para realizar o diagnóstico.

[022]. A presente invenção inova por se tratar de um peptídeo sintético, não natural e imunorreativo com anticorpos anti-SARS-CoV-2.

O ensaio ELISA indireto utilizando o peptídeo P.SC2.N.366 como antígeno apresenta 91,67% de sensibilidade e 98% de especificidade para anticorpos IgM e 100% de sensibilidade e 92% de especificidade para IgG. A elevada sensibilidade e especificidade possibilita um diagnóstico confiável e conciso. Além disso, ao testar dois anticorpos, IgM e IgG, é possível compreender melhor o estágio da doença. A presente invenção trata também de um kit de diagnóstico para COVID-19, que contém uma microplaca revestida com o peptídeo P.SC2.N.366 e todas as soluções necessárias para a realização do teste. Desta forma, este trabalho oferece uma opção original e promissora de teste sorológico para diagnóstico da COVID-19.

Descrição da abordagem do problema técnico

[023]. Até o momento, não existe nenhum medicamento eficaz para tratar a COVID-19, e são poucas as vacinas aprovadas e em uso atualmente. Por este motivo, o diagnóstico precoce é um ponto chave para controlar a situação pandêmica. As técnicas de diagnósticos moleculares, principalmente a RT-qPCR, apresentam limitações com relação ao período de detecção do vírus, que só é possível a ser realizado nas primeiras semanas da infecção viral.

[024]. Por outro lado, os testes sorológicos podem ser utilizados para diagnóstico da fase aguda, na forma do isotipo IgM, ou mesmo havendo decorrido semanas da infecção, na forma do isotipo IgG. Além disso, os testes sorológicos permitem acompanhar a soro prevalência da população após a vacinação e auxiliam nas políticas de vacinação.

[025]. Para a avaliação sorológica os ensaios sorológicos do tipo ELISA são bem consolidados e difundidos. Eles podem ser realizados em laboratórios de menor infraestrutura, e com equipe não especializada, além de serem passíveis de automação. Desta forma, os ensaios ELISA

possibilitam testagem em larga escala incluindo casos assintomáticos para qualquer doença. Para seu uso são necessários antígenos podendo ser o patógeno total, ou seus fragmentos, ou proteínas recombinantes ou ainda frações proteicas denominados epítomos antigênicos.

[026]. A utilização de antígeno peptídico de sequência artificial é uma alternativa às proteínas recombinantes, pois peptídeos apresentam potencial antigênico de um ou poucos epítomos. A utilização de alta concentração de um único epítomo oferece vantagem de aumentar a especificidade ao teste, uma vez que garante uma interação com anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2. A síntese de peptídeos é comumente realizada em equipamentos automatizados, o que permite uma produção do antígeno em grande quantidade e rápida.

[027]. Neste contexto, a presente invenção descreve o uso de um novo antígeno, o peptídeo sintético de sequência artificial P.SC2.N.366 para uso em diagnóstico sorológico. Este pode ser produzido por síntese química, em larga escala, e pode ser utilizado em uma plataforma de testagem de COVID-19. O método ELISA indireto permite identificar imunoglobulinas IgM, IgG e IgTotal pode ser utilizado para diagnóstico em diferentes fases da infecção pelo vírus, para casos clinicamente sintomáticos e assintomáticos. Além disso, o kit de diagnóstico aqui descrito reúne os insumos necessários para realização do teste de COVID-19, constituindo uma opção prática para laboratórios não especializados e para testagens em larga escala. Sendo assim, o conjunto da presente invenção é uma opção viável para teste sorológico da doença causada pelo coronavírus (SARS-CoV-2) e pode contribuir para o controle da pandemia.

Descrição detalhada da Invenção

[028]. Primeiramente, a presente invenção trata de um novo peptídeo sintético P.SC2.N.366, caracterizado por conter a sequência artificial detalhada no arquivo Txt (SEQ ID N°1). Esta sequência é composta por fragmentos base proveniente da proteína N de SARS-CoV-2 (P0DTC9.1), acrescida de uma sequência artificial de aminoácidos para conferir maior estabilidade físico-química e hidrofiliabilidade à molécula.

[029]. O peptídeo contendo esta sequência artificial pode ser utilizado como antígeno para diagnóstico sorológico em indivíduos infectados pelo vírus SARS-CoV-2. Além disso, o peptídeo pode ser utilizado para detectar os isotipos IgM e IgG (mais detalhes nos exemplos 2, 3 e 4). Desta maneira, pode ser utilizado para diagnóstico tanto na fase aguda, ou tendo decorrido algumas semanas da infecção.

[030]. O peptídeo foi sintetizado pela técnica de síntese química em suporte sólido, utilizando um equipamento automatizado MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments) e aminoácidos com grupos de proteção Fmoc. Em seguida, o peptídeo foi purificado com três lavagens com éter terc-butil-metil, congelado em ultrafreezer a -80°C e liofilizado. Após esta etapa o peptídeo encontra-se em estado sólido, e pode ser armazenado ou suspenso em água ultrapura para gerar uma solução concentrada. Por fim, a concentração da proteína em solução concentrada foi determinada utilizando o Kit Micro BSA BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific).

[031]. Uma vez que o peptídeo P.SC2.N.366 está sintetizado, ele pode ser utilizado em ensaios imunológicos para a detecção da resposta imune humoral e detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Estes ensaios sorológicos são: ELISA, Western Blotting, immunoblotting, imunofluorescência, radioensaio, microarranjo, teste de fluxo lateral,

Multiantigen Print Immunoassay(MAPIA), porém não são limitados a esses.

[032]. A presente invenção também descreve um ensaio ELISA indireto para diagnóstico sorológico da COVID-19, utilizando o peptídeo P.SC2.N.366 como antígeno. Este método compreende as etapas:

[033]. diluição do peptídeo na solução de revestimento (coating), e em seguida imobilização em suporte sólido como microplaca de alta afinidade para teste ELISA (Greiner Bio-one). A incubação é realizada overnight (12 horas) a 4°C, possibilitando o revestimento dos poços da microplaca com o antígeno. Após incubação é feita lavagem de quatro a seis vezes dos poços com solução de lavagem e na sequência é feito o bloqueio com solução de bloqueio (PBS-0,05% Tween 20 + 2% de BSA% incubação por uma hora a 37 °C).

[034]. diluição das amostras de fluido biológico, em tampão de incubação na concentração predeterminada, e adicionar aos poços da microplaca. Os anticorpos anti-SARS-CoV-2 presentes nas amostras se ligarão aos antígenos imobilizados por interação antígeno-anticorpo. Caso o indivíduo testado não apresente anticorpos anti-SARS-CoV-2, não haverá ligação, e os antígenos imobilizados ficarão livres.

[035]. adição de anticorpos secundários anti-human IgM ou anti-human IgG (Thermofisher Scientific). Estes anticorpos interagem com os isotipos IgM e IgG humanos respectivamente e são conjugadas com uma enzima, como por exemplo a enzyme horseradish peroxidase (HRP), mas não se limitando a esta. Para ensaios de IgG, é necessária uma etapa subsequente para adição de neutravidina-HRP (Thermofisher Scientific). Para ensaios de avidéz é necessária a etapa de adição de solução concentrada de Ureia.

[036]. adição da solução de revelação como, por exemplo, TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina), mas não se restringindo a esta. Após o

período de incubação, as amostras contendo anticorpos anti-SARS-CoV-2 irão reagir fortemente com a solução de TMB, enquanto que as amostras que não possuem anticorpos anti-SARS-CoV-2 apresentarão reação fraca, ou não irão reagir. Adição da solução de parada, como ácido clorídrico (Anidrol Produtos para Laboratórios), mas não se restringindo a esta. Ao final, deve ser feita a leitura da absorbância a 450 nm, e é feita a comparação do resultado com o valor do corte entre amostras biológicas positivas e negativas (Cutoff) determinado para o teste. O método aqui descrito é melhor detalhado no exemplo 2. [037].

Por último, a presente invenção também apresenta um kit para diagnóstico da COVID-19 usando o teste ELISA indireto e o peptídeo P.SC2.N.366 como antígeno. O Kit é caracterizado por conter microplaca revestida com o antígeno em concentração estabelecida, solução de lavagem, diluente de amostra, diluente do conjugado, solução de anticorpos secundários, solução de revelação, solução de parada e controle positivo e negativo. Desta forma, facilita a testagem em larga escala e em laboratórios com menor estrutura.

[038]. Constata-se que esta invenção não se limita aos protocolos, metodologias e reagentes específicos descritos, enquanto tal, que podem variar. Ademais, a terminologia aqui utilizada tem apenas o propósito de descrever os procedimentos e não se destina a limitar o âmbito da presente invenção será limitado pelas reivindicações anexas.

[039]. Por fim, a presente invenção poderá ser compreendida por meio da descrição dos resultados obtidos descritos nos exemplos 1, 2, 3, 4 e 5 que compõem este relatório descritivo.

Exemplo 1: Método de obtenção do antígeno (peptídeo epitopo) e avaliação em teste in silico

[040]. A sequência de aminoácidos do peptídeo P.SC2.N.366 (SEQ ID No. 1) foi definida a partir de uma predição de epítomos de célula B realizada por bioinformática. Para isso, foi realizada uma varredura na sequência base da proteína N de SARS-CoV-2 (P0DTC9.1), buscando por epítomos mais antigênicos. Uma vez identificado os fragmentos antigênicos, aminoácidos não naturais foram adicionados à sequência, compondo assim a SEQ ID No. 1 (Tabela1). O resultado foi a construção de um peptídeo bastante antigênico, contendo epítomos da proteína N. As ferramentas utilizadas foram BepiPred-2.0, BcePred, IEDB e o software DNASTAR. Estas ferramentas fornecem um valor predito para a sequência de aminoácidos, quanto mais próximo de um for este valor predito, maior será a antigenicidade da sequência (SWEREDOSKI, Michael J.; BALDI, Pierre. PEPITO: improved discontinuous B-cell epitope prediction using multiple distance thresholds and half sphere exposure. *Bioinformatics*, v. 24, n. 12, p. 1459-1460, 2008; GALGONEK, Jakub et al. Amino acid interaction (INTAA) web server. *Nucleic acids research*, v. 45, n. W1, p. W388-W392, 2017; SAHA, Sudipto; RAGHAVA, Gajendra Pal Singh. BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. In: *International Conference on Artificial Immune Systems*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2004. p. 197-204; FREIRE, Paulo. A importância do ato de ler em três artigos que se completam: Volume 22. Cortez editora, 2017).

Tabela 1. Predição da antigenicidade do novo peptídeo P.SC2.N.366 por quatro diferentes ferramentas de bioinformática. Quanto mais próximo de um o valor predito, mais antigênica terá a sequência de aminoácidos.

Cod.	SEQ.ID	BepiPred-2.0	BcePred	IEDB	DNASTAR
P.SC2.N.366	SEQ ID No. 1	0,5	0,887	0,916	0,815

[041]. Em seguida, foi avaliada a similaridade da sequência do peptídeo com sequências dos organismos SARS-CoV-2 (taxid:2697049), MERS (1335626), H1N1 (taxid:114727) e humanos (taxid:9606). Esta análise foi feita usando a ferramenta BLASTp e as sequências foram comparadas em termos de cobertura e identidade (ALTSCHUL, Stephen F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997).

[042]. A cobertura e identidade da SEQ ID No. 1 com o vírus SARS-CoV-2 foram de 100 e 89%. Deste modo, o peptídeo P.SC2.N.366 apresenta alta similaridade com o organismo alvo, contribuindo para uma elevada especificidade do teste. Mas a sequência de aminoácidos do peptídeo não corresponde a uma sequência natural, pois a maior identidade encontrada foi de 89% com a proteína N de SARS-CoV-2.

[043]. A SEQ ID No. 1 também apresentou baixa similaridade para organismos MERS, H1N1 e humanos, diminuindo o risco de reação cruzada e contribuindo para uma maior especificidade do teste de diagnóstico. Ainda, a SEQ ID No. 1 foi comparada com sequências já patenteadas, e todas as sequências encontradas apresentam cobertura e/ou identidade menores do que 95% (database Patented Protein Sequence).

[044]. Em seguida, foi determinado o índice GRAVY do peptídeo utilizando a ferramenta ProtParam-Expasy. O índice GRAVY é utilizado para representar o valor de hidrofobicidade de um peptídeo. Ele é calculado a partir da soma dos valores de hidrofobicidade de todos os aminoácidos individuais e dividido pelo comprimento da sequência. Assim, o peptídeo P.SC2.N.366 apresentou um índice GRAVY de -2,593, indicando tendência a ser hidrofílico. Esta característica é desejada,

uma vez que peptídeos solúveis em água são mais simples de manejar, principalmente em maiores escalas (GASTEIGER, Elisabeth et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The proteomics protocols handbook, p. 571-607, 2005).

[045]. Definida a sequência SEQ ID No. 1, o peptídeo P.SC2.N.366 foi sintetizado quimicamente. A síntese foi realizada em equipamento automatizado MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments), pela técnica de síntese ancorada em matriz sólida. Após a síntese, o peptídeo foi purificado com lavagens sucessivas com solvente éter terc-butil-metil. Em seguida foi congelado em freezer a -80°C e passou por um processo de liofilização em equipamento liofilizador Modulyod Freeze Dryer (ThermoFischer) até a solidificação. Por fim, o peptídeo foi ressuscitado em água ultrapura, a concentração da solução final foi determinada utilizando o kit Micro BCA Protein Assay (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).

Exemplo 2: Reatividade do peptídeo com anticorpos anti-SARS-CoV-2 e padronização de ensaio ELISA indireto para detectar anticorpos IgM, IgG e Ig

[046]. Uma vez preparada a solução concentrada do peptídeo P.SC2.N.366, ele foi testado como antígeno pela técnica de ELISA indireta para detecção de anticorpos específicos para SARS-CoV-2. Para isso, foram necessárias amostras biológicas provenientes de indivíduos infectados pelo vírus, e que tiveram resultado positivo para COVID-19 pelo teste RT-qPCR. A coleta e uso dos soros foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) nº 4.421.856. Se as amostras de indivíduos infectados reagirem fortemente no ensaio ELISA e as amostras

de indivíduos não infectados não reagirem ou reagirem de maneira fraca, então o antígeno reage especificamente com anticorpos anti-SARS-CoV-2 e o ensaio consegue fazer a diferenciação entre os grupos infectados e não infectados.

[047]. Contudo, ao realizar um teste ELISA, é necessário estabelecer as condições ótimas para a reação. Este processo de padronização de diluições ou concentrações das condições ótimas de trabalho foi feita primeiramente por testes *in silico* e depois realizadas em condições experimentais. Os parâmetros avaliados foram a massa de peptídeo por poço, concentração da solução de bloqueio, fator de diluição das amostras biológicas, fator de diluição da solução dos anticorpos secundários conjugados anti-human-IgM-HRP ou anti-human-IgG-Biotina ou anti-human-Ig-HRP, fator de diluição de proteína conjugada neutravidina com peroxidase (para o isotipo IgG), e por último o tempo para parada da reação (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros avaliadas na padronização do ensaio ELISA indireto.

Parâmetro	Faixa avaliada
Massa de peptídeo por poço	10 – 120 ng
Concentração da solução de bloqueio	1 – 5%
Fator de diluição da amostra biológica	1:400 – 1:50
Fator de diluição do anticorpos secundário	1:25000 - 1:5000
Fator de diluição de neutravidina-HRP	1:25000 – 1:5000
Tempo de parada	5 – 60 minutos

[048]. O ensaio ELISA indireto se inicia com a diluição do peptídeo em tampão carbonato (0,05M, pH 9.6), mas não se restringindo a este. A concentração de peptídeo na solução diluída varia de 0,1 a 1,2 ng/ μ L. Em seguida, a solução é pipetada nos poços da microplaca de alta aderência (suporte sólido) de modo que a massa de peptídeo por poço varie de 10 a 120 ng. A microplaca permanece incubada a 4°C overnight, permitindo que o peptídeo se ligue e permaneça aderido à sua superfície. Os suportes sólidos incluem microplacas de alta afinidade, que podem ser de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno ou poliestireno, mas não se restringindo a estas.

[049]. Posteriormente, são realizadas quatro lavagens dos poços com solução de lavagem 1x (PBS 100 mM, Tween 20 a 0,05%, pH 7.4). Adiciona-se solução de bloqueio de soro albumina bovina (BSA) variando de 1 a 5% em tampão PBS, pH 7.4, mas não se restringindo a estas concentrações. E são realizadas outras quatro a seis lavagens.

[050]. Em seguida, amostras de fluido biológico (sangue, soro, plasma, saliva, urina ou lágrima) são adicionadas ao suporte sólido. Neste exemplo a amostra é soro. Estas amostras biológicas devem ser diluídas e as taxas de diluição variaram de 1:50 a 1:400. O diluente das amostras é o tampão de incubação composto de caseína em concentração entre 1,6 e 4,4% (m/v) em solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7.4, mas não se restringindo a este. As moléculas presentes nas amostras que não interagem especificamente com o antígeno imobilizado são removidas por seis lavagens.

[051]. Em seguida, são adicionados soluções de anticorpos secundários, que tem por característica serem conjugados com isótopos radioativos, enzimas ou fluoróforos, mas não se restringindo a estes. Os anticorpos secundários variam de acordo com o anticorpo alvo do teste, e devem ser diluídos em tampão de incubação nas

diluições 1:5000 a 1:25000. O poço é então lavado seis vezes com solução de lavagem.

[052]. Caso o anticorpo conjugado esteja ligado com biotina, é necessário adicionar uma molécula conjugada como uma enzima. Neste caso podem ser utilizadas Neutravidina, Estreptavidina e Avidina, os quais são diluídos na solução de incubação em uma faixa de 1:5000 a 1:25000 e adicionados aos poços. Novamente o suporte sólido é lavado seis vezes.

[053]. Posteriormente é adicionada solução de revelação ao suporte sólido, como TMB e OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride), mas não se restringindo a estas. O tempo de incubação varia de 5 a 60 minutos, após este tempo a reação é interrompida pela adição de solução de parada (HCL 5M), mas não se restringindo a esta. 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-SARS-CoV-2.

[054]. O peptídeo P.SC2.N.366 foi testado para detecção de IgM e IgG isoladamente e também de Ig Total (IgM, IgA e IgG concomitantemente). O sinal obtido para os ensaios mostraram que um pool de soros composto por amostras de indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 reagiu fortemente no ensaio ELISA, enquanto que o pool composto por amostras de indivíduos não infectados reagiu não reagiu ou fracamente. Esta diferença foi observada para todos isotipos testados (Figura 1), e mais detalhes são descritos no exemplo 3.

[055]. Estes resultados indicam a imunorreatividade do peptídeo frente aos anticorpos IgM, IgG e Ig Total anti-SARS-CoV-2 presentes no soro de pacientes infectados, e confirma a possibilidade dele ser utilizado em imunoenaios.

Exemplo 3: Validação do uso do peptídeo P.SC2.N.366 como antígeno para diagnóstico de COVID-19

[056]. Para a validação do antígeno para detecção de anticorpos IgM foi utilizado um painel de 62 soros (12 soros positivos e 50 negativos). Já para a detecção de anticorpos IgG foi utilizado um painel com 99 soros (49 positivos e 50 negativos). A diferença na quantidade de amostras biológicas entre os dois isotipos de imunoglobulinas foi dado pela disponibilidade de amostras positivas para IgG ser maior em relação às amostras com infecção recente (IgM positivas). Estes painéis de soros foram avaliados pelo ensaio ELISA indireto utilizando o peptídeo P.SC2.N.366, utilizando o protocolo descrito no exemplo 2. Dentre os soros positivos existem casos de COVID-19 sintomáticos e assintomáticos.

[057]. A partir dos resultados obtidos para os testes de detecção de IgM e IgG, foram determinados os índices AUC (area under the ROC curve), a sensibilidade, a especificidade, o índice J de Youden e o valor do corte da reação entre positivos e negativos (cutoff) (ver Tabela 3).

[058]. O ensaio para IgM apresentou sensibilidade de 91,67% e especificidade de 98,00%, e permitiu a diferenciação clara entre os grupos de amostras positivas e negativas (Figuras 2 e 3). O mesmo foi observado no ensaio para IgG (Figuras 4 e 5), que também apresentou sensibilidade de 100,00% e especificidade de 92,00%. Assim, demonstra-se a potencialidade do antígeno P.SC2.N.366 de detectar a presença de anticorpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 através de um ensaio sorológico, tanto para casos sintomáticos quanto assintomáticos da doença.

Tabela 3. Parâmetros do uso do peptídeo P.SC2.N.366 para diagnóstico de COVID-19.

Anticorpo	Parâmetro	Valor
IgM	AUC	0,925
	Sensibilidade	91,67%
	Especificidade	98,00%
	J de Youden	0,8967
	Cutoff	0,443
IgG	AUC	0,983
	Sensibilidade	100,00%
	Especificidade	92,00%
	J de Youden	0,9200
	Cutoff	0,475

Exemplo 4: Determinação do índice de avides do peptídeo P.SC2.N.366

[059]. Para a determinação do índice avides, um segundo grupo de 38 soros positivos foram testados pelo ensaio ELISA de avides. Este ensaio é similar ao ensaio descrito no exemplo 2 para detecção de anticorpos IgG acrescido de uma etapa posterior à adição da amostra biológica diluída. Esta etapa adicional consiste na adição de solução de ureia 6M, e incubação de 10 minutos. Os anticorpos de baixa avides serão desligados e removidos por seis lavagens com solução de lavagem (descrito no exemplo 2), enquanto que os anticorpos de alta avides permanecerão ligados.

[060]. O índice de avides é obtido ao dividir-se o valor da absorbância do ensaio com a adição da ureia, pelo valor da absorbância sem a adição de ureia para cada amostra biológica

individual. Em seguida, é calculada a média para o número total de amostras (equação 1).

Equação 1:

$$\text{Índice de Aidez} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{(\text{Absorbância com ureia})_i}{(\text{Absorbância sem ureia})_i} \cdot 100 \right) / n$$

[061]. Valores de índice de aidez acima de 60% são considerados alta aidez, entre 50 e 60% média aidez e abaixo de 50% baixa aidez. O peptídeo P.SC2.N.366 apresentou índice aidez de 64%, portanto é considerado de alta aidez. Ou seja, a força de ligação entre o peptídeo e os anticorpos anti-SARS-CoV-2 é alta. Desta forma, o peptídeo tem potencial para ser utilizado em análises de reações cruzadas, estudos epidemiológicos e até para controle de programas de vacinação.

Exemplo 5: Preparo do Kit de Diagnóstico para COVID-19

[062]. O Kit de diagnóstico (Figura 6) é caracterizado por conter todas as soluções necessárias para realizar do teste de COVID-19, como descrito no exemplo 2. Além de conter uma microplaca de 96 poços, previamente sensibilizada com o novo antígeno P.SC2.N.366, e bloqueada com solução de bloqueio.

[063]. As soluções incluídas no kit são:

1. Solução de lavagem (PBS 100 mM, Tween-20 a 0,05%, pH 7.4) acondicionada em frasco plástico de 50 mL;
2. Tampão de incubação diluente (PBS 100 mM, caseína entre 1,6 e 4,4% (m/v), pH 7.4), acondicionada em frasco plástico de 50 mL;
3. Solução de anticorpo secundário Anti-IgM (diluído 1:5000 a 1:25000) , acondicionada em frasco plástico de 2 mL;

4. Solução de anticorpo secundário Anti-IgG (diluído 1:5000 a 1:25000), acondicionada em frasco plástico de 2 mL;
5. Solução de conjugado neutravidina-peroxidase (diluído 1:5000 a 1:25000), acondicionada em frasco plástico de 2 mL;
6. Solução substrato de revelação: solução de substrato cromogênico TMB, acondicionada em frasco plástico escuro de 50 mL;
7. Solução de parada da reação: solução aquosa composta de HCL 5 M, acondicionada em frasco plástico escuro de 50 mL.
8. Controles de soros positivo e negativo, acondicionados em microtubos plásticos de 2 mL;

[064]. Uma caixa é utilizada para guardar os reagentes, podendo ser de material plástico, papel ou uma combinação. Os frascos de soluções e a microplaca sensibilizada são acondicionados de forma a ficarem fixos no interior da embalagem. O Kit deve ser mantido a uma temperatura de 2 a 8 °C até o momento do uso.

[65]. O Kit necessário é útil pela praticidade na realização do ensaio, permitindo fazer uma testagem rápida, em ambiente de baixa infraestrutura e por uma equipe com baixo treinamento. Desta maneira, contribui para a testagem em massa, essencial no controle de epidemias.

Descrição das Figuras

[065]. Figura 1 – Valores de absorvância obtidos na padronização do ensaio ELISA indireto utilizando o peptídeo P.SC2.N.366 como antígeno. São mostrados os valores obtidos para um pool de soros positivos e negativos, bem como a diferença de absorvância e a proporção entre eles. Os valores correspondem aos testes de IgM, IgG e Ig Total.

[066]. Figura 2 – Receiver operator characteristic curve (CURVA ROC) do teste ELISA utilizando o peptídeo P.SC2.N.366 para imunodeteção de anticorpos IgM anti-SARS-CoV-2. O AUC de 0,925 é indicador de excelentes resultados na diferenciação entre soros positivos e negativos.

[067]. Figura 3 – Distribuição da reatividade de indivíduos positivos e negativos do teste ELISA indireto utilizando o peptídeo P.SC2.N.366 para imunodeteção de anticorpos IgM anti-SARS-CoV-2. Foram utilizados 12 soros positivos e 50 soros negativos.

[068]. Figura 4 – Receiver operator characteristic curve (CURVA ROC) do teste ELISA utilizando o peptídeo P.SC2.N.366 para imunodeteção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2. O AUC de 0,983 indica que o peptídeo usado como antígeno é também capaz de detectar anticorpos IgG.

[069]. Figura 5 – Distribuição da reatividade de indivíduos positivos e negativos do teste ELISA indireto utilizando o peptídeo P.SC2.N.366 para imunodeteção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2. Foram utilizados 49 soros positivos e 50 soros negativos.

[070]. Figura 6 - Componentes do kit ELISA para diagnóstico de COVID-19 utilizando o peptídeo P.SC2.N.366 como antígeno. Os itens mostrados são: caixa para armazenar os reagentes, microplaca de 96 poços revestida com o antígeno P.SC2.N.366, solução de lavagem, tampão de incubação, soluções de anticorpos secundários (anti-IgM, anti-IgG e marcador-HRP), solução substrato de revelação, solução de parada da reação. O kit contém também controles positivo e negativo é dado na figura.

Definições

[071]. Anticorpos ou imunoglobulinas (Ig), são proteínas presentes no sangue que atuam como mediadores da imunidade humoral específica. As moléculas de anticorpos interagem de modo específico com um antígeno, e mediam diversos mecanismos efetores que servem para eliminar tais antígenos.

[072]. Um antígeno é uma molécula capaz de estimular uma resposta imune. Cada antígeno tem características de superfície distintas, ou epítomos, resultando em respostas específicas. Epítomo é uma pequena porção desta molécula onde efetivamente ocorre a interação com os anticorpos.

[073]. Durante a infecção do hospedeiro por um patógeno, anticorpos específicos são produzidos. A presença destes anticorpos específicos pode ser utilizada para diagnosticar indiretamente a infecção através de ensaios sorológicos (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology. ed. 9. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2017).

[74]. Sensibilidade se refere à capacidade do teste de fornecer resultado positivo quando o indivíduo realmente for portador do vírus.

[75]. Especificidade se refere à capacidade do teste fornecer resultado negativo quando o indivíduo realmente for negativo.

[76]. O índice J de Yonden é uma maneira de sumarizar o desempenho de um teste de diagnóstico, sendo calculado pela soma de sensibilidade e especificidade menos uma unidade.

[77]. O cutoff é o valor a partir do qual o resultado é considerado positivo.

[78]. O índice AUC demonstra a capacidade do peptídeo de diferenciar indivíduos infectados de não infectados.

REIVINDICAÇÕES

1. PEPTÍDEO P.SC2.N.366 caracterizado por consistir na sequência SEQ ID N°: 1.
2. PEPTÍDEO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser utilizado como antígeno para detecção de anticorpos circulantes ou outras moléculas ligantes contra a doença COVID-19 em imunoenaios.
3. PEPTÍDEO, produzido por via sintética ou recombinante de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizados por detectar moléculas ligantes aos mesmos por ensaios imunológicos, como, por exemplo, testes imunoenzimáticos (ELISA, Western Blot, imunofluorescência, imunohistoquímica, EA, MEIA e outros), testes por imunoadglutinação, sensores eletroquímicos, ou de qualquer outra forma de detecção relacionada direta ou indiretamente em amostras de fluídos corporais, como saliva, urina, sangue, soro.
4. PEPTÍDEO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser utilizado como ligante à imunoglobulinas presentes no soro e/ou moléculas envolvidas direta ou indiretamente no processo de autoimunidade.
5. MÉTODO ELISA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19 UTILIZANDO O PEPTÍDEO P.SC2.N.366 (Seq ID N°1) COMO ANTÍGENO, definido na reivindicação 1, caracterizado por compreender as etapas de:
 - a) ligação de anticorpos contra-SARS-CoV-2 de uma amostra de fluido biológico como sangue, soro, plasma, saliva, urina ou lágrima, a um ou mais peptídeos que contenham a sequência de aminoácidos Seq ID N° 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 na amostra supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligados ao dito anticorpo anti-SARS-CoV-2.

6. MÉTODO ELISA de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela realização da etapa (a) mediante o uso do peptídeo P.SC2.N.366 (Seq ID N°1), definido nas reivindicações 1 e 2, na faixa de concentração 10 a 120 ng/poço, em sua forma original, com modificação em suas extremidades ou na forma de polímeros constituídos de repetições de uma sequência peptídica, podendo ser separadas por qualquer método, incluindo espaçadores ou linkers.
7. MÉTODO ELISA de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela realização da etapa (a) mediante o uso de solução de bloqueio BSA variando de 1 a 5%, diluição da amostra biológica na faixa de 1:50 a 1:400 no tampão de incubação, realização da etapa (b) mediante a diluição do anticorpo secundário ou proteína na faixa de proporção de 1:5000 até 1:25000 no tampão de incubação e da realização da etapa (c) mediante a variação do tempo de incubação de 5 a 60 minutos.
8. KIT ELISA PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19 utilizando novo antígeno peptídeo sintético P.SC2.N.366 (Seq ID N°1), definido nas reivindicações 1 e 2. Utilizando método ELISA de acordo com as reivindicações 5, 6 e 7. O kit é caracterizado por compreender: microplaca revestida com o antígeno P.SC2.N.366 (Seq ID N°1), solução de lavagem, diluente de amostra, diluente do conjugado, solução de anticorpos secundários, solução substrato de revelação, solução de parada da reação e os controles positivo e negativo.
9. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por usar suporte sólido para depósito do antígeno P.SC2.N.366 (Seq ID N°1), na faixa de concentrações de 10 a 120 ng/poço, podendo usar os

materiais nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno ou poliestireno, mas não se restringindo a estes, sendo que o antígeno pode ser usado em sua forma original, com modificação em suas extremidades, ou na forma de polímeros constituídos de repetições de uma sequência peptídica, ou ser separadas por qualquer método, incluindo espaçadores, ligado a um suporte sólido ou acondicionado em solução em frasco próprio.

10. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por utilizar uma solução tampão de bloqueio composto de albumina, mais especificamente BSA (*bovine serum albumin*), diluída em solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4, na faixa de concentração de 1 a 5% (m/v), ligada a um suporte sólido ou acondicionada em frasco próprio, mas não se restringindo a este, podendo ser outras soluções e bloqueio como caseína.
11. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela solução tampão de lavagem compreender uma solução aquosa, composta de PBS 100 mM e Tween 20 em concentração de 0,05% (m/v), acondicionada em frasco próprio, mas não se restringindo a esta.
12. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela solução tampão de incubação compreender uma solução aquosa 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 próprio.
13. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por uso de anticorpos secundários, compreendendo soluções aquosas de imunoglobulinas, mais especificamente, anticorpos anti-human-IgM e anti-human-IgG, conjugadas a uma enzima ou marcador, acondicionadas em frasco próprio.
14. KIT ELISA de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela solução de revelação compreender um substrato cromogênico,

mais especificamente, solução de TMB (5,5'-tetrametilbenzidina) ou de OPD (o-phenylenediaminedihydrochloride) e solução de parada compreender solução de HCL 5 M, mas não se restringindo a estas, ambas acondicionadas em frascos próprios.

15. USO DO PEPTÍDEO P.SC2.N.366 (Seq ID N°1), conforme definidos nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser utilizado na preparação de uma composição imunogênica, para estimular ou desestimular o sistema imune humano ou animal contra doenças como COVID-19.
16. COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, caracterizado por compreender um ou uma associação de peptídeos definidos nas reivindicações 1 e 2 e ao menos um adjuvante fisiologicamente aceitável.

DESENHOS

Figura 1 →

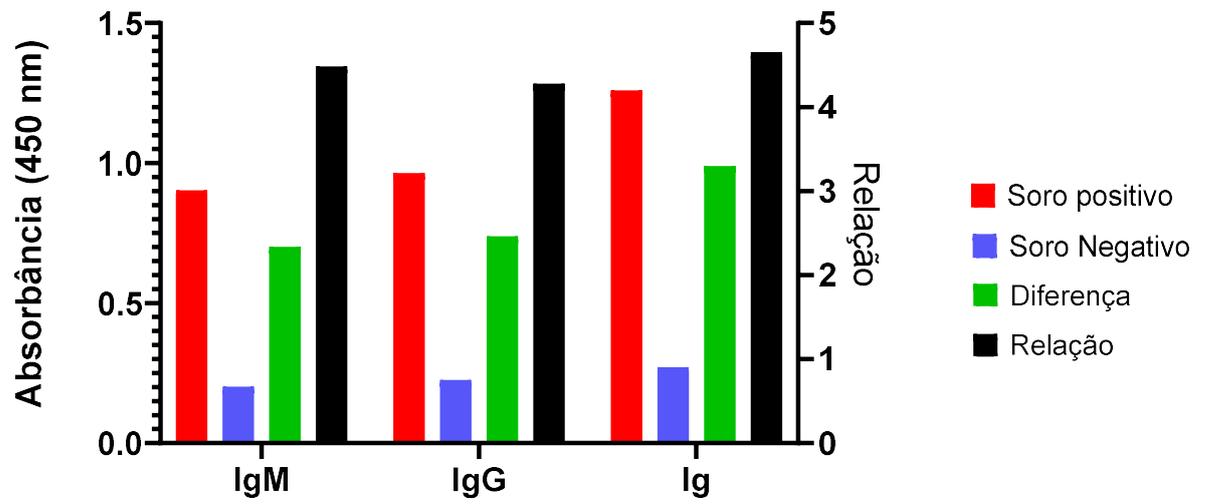


Figura 2→

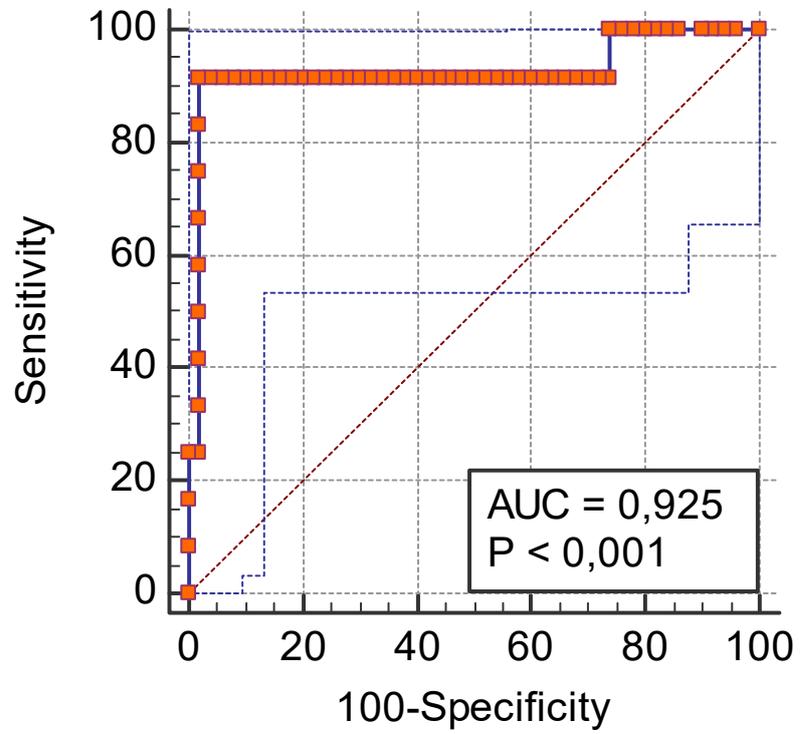


Figura 3→

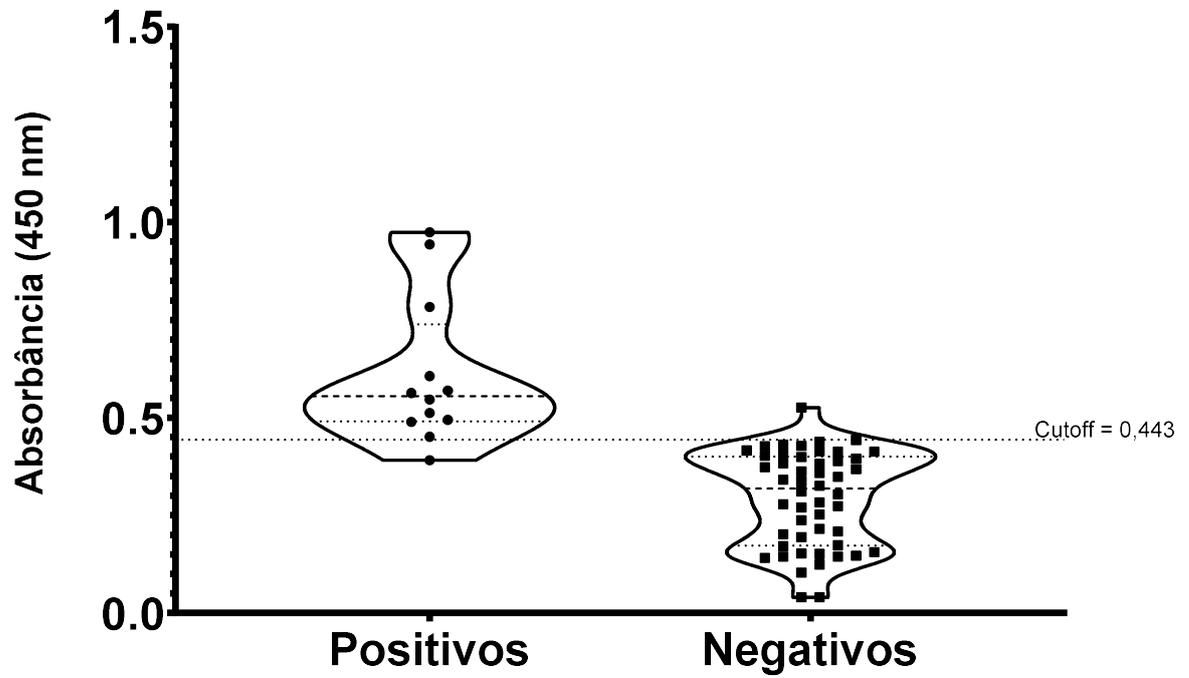


Figura 4→

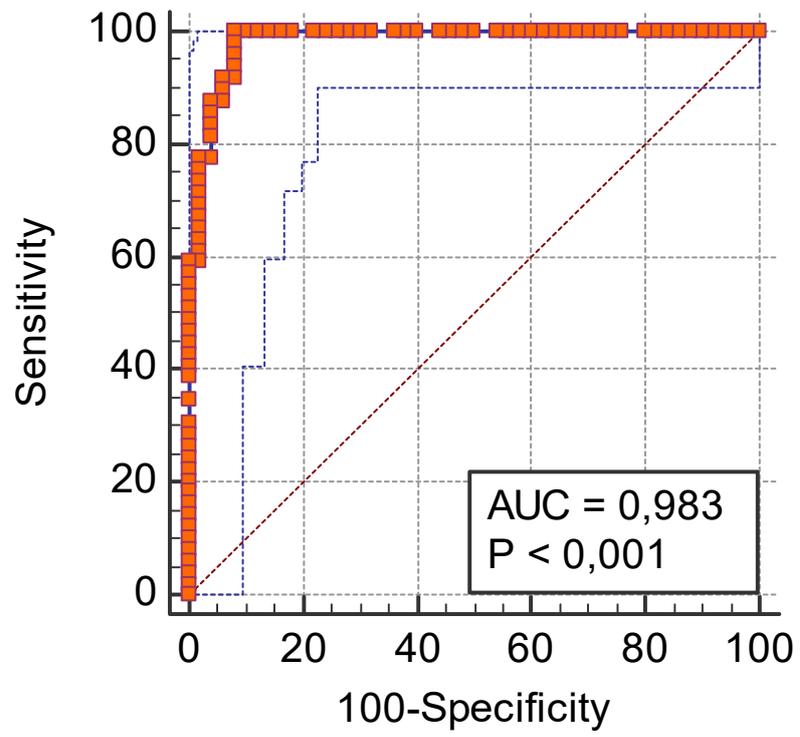


Figura 5→

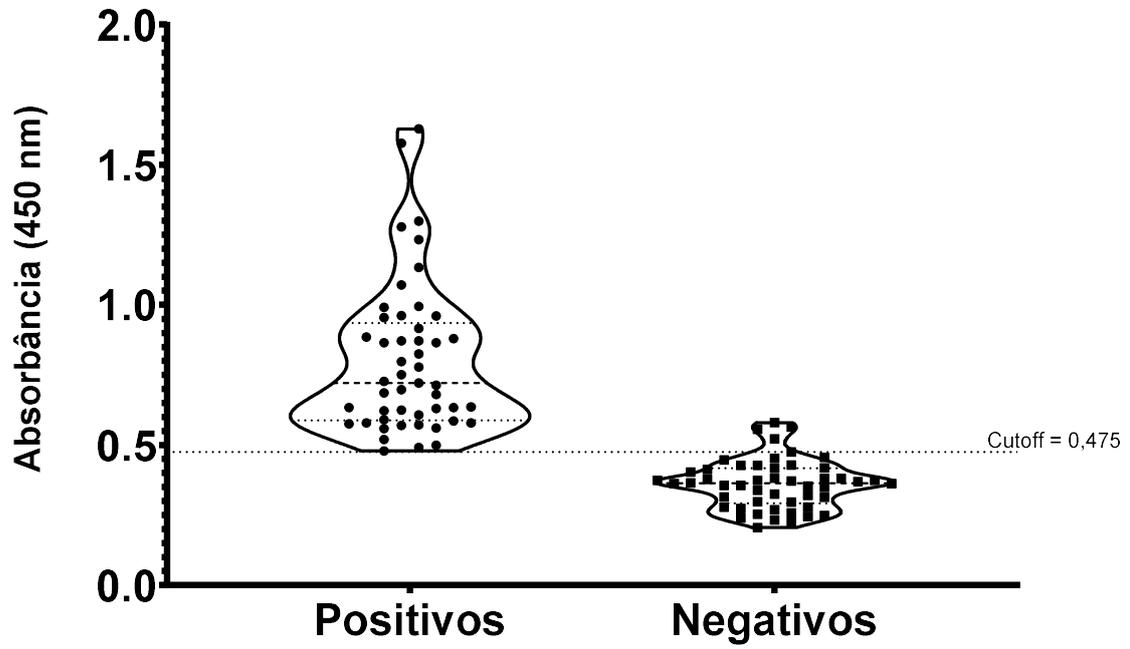


Figura 6→

