REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020024403-5

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 102020024403-5

(22) Data do Depósito: 30/11/2020

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

(51) Classificação Internacional: C07K 7/08; G01N 33/569.

(54) Título: ANTÍGENOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA O DIAGNÓSTICO DO SARS-COV-2

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

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

Código de Controle: 8C41E98CDEA28B2D B221BFD9AE969D57

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 30/11/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 22/08/2023

Assinado digitalmente por:
Alexandre Dantas Rodrigues
Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

ANTÍGENOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA O DIAGNÓSTICO DO SARS-COV-2

Campo da invenção

[001]. A presente invenção reinvindica a proteção dos peptídeos P.SC2.S.130 (SEQ NO 2), P.SC2.S.131 (SEQ NO 3), P.SC2.S. 137 (SEQ NO 4) P.SC2.S.136 (SEQ NO 5), P.SC2.S.138 (SEQ NO 6), P.SC2.S.202 (SEQ NO 7), P.SC2.S.204 (SEQ NO 8), P.SC2.S.205 (SEQ NO 9) em especial P.SC2.S.203 (SEQ NO 1) e seu uso em método imunológico para o diagnóstico de COVID-19, em indivíduos com suspeita de infecção com sintomas ou assintomática. Deve-se considerar que esta invenção não se limita à metodologia, protocolos e reagentes específicos descritos, enquanto tal, que podem variar. Também se deve entender que a terminologia aqui utilizada tem apenas o propósito de descrever procedimentos particulares e não se destina a limitar o âmbito da presente invenção, que será limitado apenas pelas reivindicações anexas.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. Os coronavírus (CoV) são uma família de vírus altamente diversificada de RNA, com fita simples de sentido positivo, e que usa uma enzima replicase de DNA (ou uma polimerase de RNA dependente) em sua replicação. Eles infectam um vasto grupo de espécies, entre eles os seres humanos, aves, animais de companhia e gado, que podem ser reservatórios do vírus. Os CoV são da ordem de *Nidovirales*, subordem de *Coronavirineae*, família *Coronaviridae*, subfamília de *Orthocoronavirinae*, que se subdividem em quatro gêneros: *alfacoronavírus*, *betacoronavírus*, *gama-coronavírus* e *deltacoronavírus*. O gênero *betacoronavírus* infecta exclusivamente espécies de mamíferos, e onde se encontra os vírus da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), SARS-CoV, MERS-CoV, sendo altamente patogênicos e de origem zoonótica. As

infecções por coronavírus humanos e animais resultam principalmente em doenças respiratórias e entéricas (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2020)

[003]. A doença COVID-19 (*coronavirus disease* 2019) surgiu em dezembro de 2019, na China, e se espalhou rapidamente pelo mundo causando um grave problema de saúde pública mundial (ROTHAN; BYRAREDDY, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020).

[004]. A COVID-19 é uma doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, que tem como alvo principal o sistema respiratório e pode causar o um quadro respiratório agudo, caracterizado por, pelo menos dois dos seguintes sintomas: sensação febril ou febre associada a dor de garganta, dor de cabeça, tosse, coriza, sendo potencialmente fatal (GUAN *et al.*, 2020).

[005]. O RNA viral do SARS-CoV-2 codifica quatro proteínas estruturais: *small envelope* (E); matrix (M), Nucleocapside (N) spike glicoproteina (S); cinco proteínas acessórias (Orf3a, Orf6, Orf7a, Orf8, Orf10) e uma poliproteína de estrutura de leitura aberta 1a e 1b, codificada no Orf1ab, a qual pode ser clivada proteoliticamente em 16 proteínas putativas não-estruturais (nsps), que podem estar envolvidas na replicação e transcrição do RNA viral (CHAN, Jasper Fuk-Woo *et al.*, 2020). As proteínas E e a M são importantes na montagem viral do coronavírus. A proteína N forma complexos com o RNA genômico e é importante para aumentar a eficiência da transcrição e montagem viral (WANG, Hongye *et al.*, 2020).

[006]. A glicoproteína S se liga ao receptor enzimático conversora de angiotensina 2 (ACE2) das células hospedeiras. A proteína S é uma glicoproteína trimérica de fusão viral classe I que é processada proteoliticamente em subunidades S1 e S2 que permanecem associadas, não covalentemente, e um estado de pré-fusão. O acoplamento do vírus com ACE2 é pelo domínio receptor de

ligação (RBD) em S1, onde ocorrem rearranjos conformacionais que causam o desprendimento de S1, e clivagem da S2 por proteases da célula hospedeiras, e exposição de um peptídeo de fusão adjacente ao sítio de proteólise de S2 (CHAN, Kui K. *et al.*, 2020). A sequência de aminoácidos desta proteína é conservada entre os CoV, principalmente na sub unidade S2 (HU *et al.*, 2020), tornando esta proteína de grande interesse para o desenvolvimento de vacinas e metodologias de diagnóstico.

[007]. O diagnóstico do COVID-19 baseia-se inicialmente nas manifestações clínicas dos pacientes infectados com SARS-CoV-2. Todavia, estes são insuficientes para um diagnóstico definitivo dado que os sintomas e sinais de infecção por COVID-19 são semelhantes aos de muitas outras doenças febris e respiratórias comuns. Para ter um diagnóstico final são necessários exames auxiliares, sendo os mais comuns: testes moleculares e sorológicos. Diagnósticos fiáveis são fundamentais para a detecção de casos de COVID-19, para interromper a transmissão, compreensão da epidemiologia, controle da eficácia dos medicamentos e do impacto das medidas sociais e de saúde pública (WHO - R&D BLUEPRINT, 2020).

[008]. Desde o início da pandemia, foram confirmados mais de 50 milhões de casos, com 1, 25 milhões mortes em todo o mundo. Brasil ocupa o terceiro lugar no número de casos confirmados (5,6 milhões) e o segundo no número de mortes (0,16 milhões), e foram realizados cerca de 21,9 milhões de testes diagnósticos (Worldometer. Worldometer's COVID-19 data. 2020. Disponível em: https://www.worldometers.info/coronavirus/. Acesso em: 01/11/2020), para realizar este número de testes no Brasil até o início de novembro de 2020, existiam 68 testes aprovados pela ANVISA para comercialização, dos quais 53 testes são testes sorológicos com base em proteínas recombinantes da SARS-COV-2 principalmente a proteína S (data. 2020.

Disponível em: https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?avance=all&type=all&test_target=all&status=Brazil+ANVISA&section=immunoassays&action=default#diag_tab Acesso em: 01/11/2020).

[009]. Os testes moleculares são aqueles que permitem identificar o agente causador da doença pela detecção do seu material genético. O principal teste desta categoria, empregado no diagnóstico da COVID-19, é o "*reverse transcriptase real time Polimerase chain reaction" (*RT-qPCR). A sensibilidade desta técnica é influenciada pelo tipo de amostra biológica com que a análise se inicia. Por estimativa, a frequência dos resultados negativos quando os pacientes são testados somente uma vez chegou a 30-50% em casos reais de COVID-19, e um grande número de casos "suspeitos" com características clínicas típicas de COVID-19 (WANG, Yishan *et al.*, 2020). Além disso, o período de 2 a 3 semanas após início de sintomas, a carga viral começa a decrescer, tornando o processo de isolamento do material genético difícil devido à baixa carga, o que pode gerar resultados falsos negativos. Outras possíveis fontes de erro nesta técnica seriam encontradas na forma como a amostra é colhida. Este passo é de grande importância para qualquer metodologia baseada na detecção de material genéticos, qualquer erro nesta fase geraria um aumento de resultados falsos positivos ou falsos negativos (PASCARELLA *et al.*, 2020).

[010]. Testes sorológicos detectam a presença de anticorpos específicos contra o agente patogênico, pela interação de antígeno-anticorpo, mensurando as respostas de anticorpos contra patógenos em fluidos corporais, especialmente em amostras de sangre, soro, saliva e outros (LI *et al.*, 2020). Algumas técnicas bem estabelecidas são o ensaio imunoenzimatico - ELISA do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) em suas diferentes variantes (direto, indireto, sandwich, doble sandwich, competitivo), imunocromatografia (ou fluxo lateral),

imunoeletroquimica. Em comparação com as metodologias com base na PCR, os testes serológicos são vantajosos com um tempo de resposta mais rápido, alto rendimento, menos carga de trabalho, diagnóstico da infecção, a medição de anticorpos protetores após a vacinação e também a avaliação da prevalência da imunidade em uma população (SETHURAMAN *et al.*, 2020).

[011]. Uma grande variedade de moléculas pode ser utilizada em testes sorológicos, como proteínas, peptídeos, ácidos desoxirribonucleicos (ADNs), ácido ribonucleicos (ARNs), antibióticos, drogas hormônios, entre outros. Os quais refletem diretamente na especificidade alcançada pelo teste (HOSSEINI *et al.*, 2018). Para diagnósticos do COVID-19, fazendo uso da metodologia do ELISA, os antígenos recombinantes, provenientes de duas proteínas virais, *spike* (S) e nucleocapside (N) se destacam para o desenvolvimento de testes detectando anticorpos IgM e IgG (LIU *et al.*, 2020). Sendo o uso da proteína S a apresentar maior sensibilidade (KONTOU *et al.*, 2020; ONG *et al.*, 2020).

[012]. Uma alternativa ‘as proteínas recombinantes são os peptídeos sintéticos, os quais têm sido explorados como antígenos para diagnósticos sorológicos de diversas doenças, por serem capazes de apresentarem alta antigenicidade, alta afinidade antígeno-anticorpo e especificidade (VAN REGENMORTEL, 2001). Estes são sintetizados pela técnica de *SPOT-synthesis* ou em suporte sólido utilizando aminoácidos com grupos protetores, como F-moc (HILPERT; WINKLER; HANCOCK, 2007). A sua síntese pode ser realizada em equipamentos automatizados, propiciando reprodutibilidade e agilidade. Esta abordagem vem sendo explorada em diferentes estudos bioinformáticos, proteômicos ou imunológicos. Onde são identificados epítopos das diferentes proteínas do vírus, encontrando regiões de grande potencial para o desenvolvimento de vacinas. Isto também

poderia ser aplicado ao desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico, em especial na identificação anticorpos contra SARS-CoV-2 do tipo IgM e IgG (CHAN, Kui K. *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2020; WANG, Hongye *et al.*, 2020).

[013]. Para contextualizar o estado da arte desta invenção e observar as inovações nesse campo, foi realizada uma busca por documentos patentários referentes a testes sorológicos para diagnóstico de COVID-19 em humanos usando peptideos em bases do INPI, Pantent Scope, Patent Inspiration, Espacenet e Derwent. Não foram encontrados documentos patentários para o uso de peptídeos em diagnóstico para COVID-19. Patentes, foram encontradas para a utilização de proteínas recombinantes referentes a imunoensaios, mais especificamente do teste ELISA, fluxo lateral e IFTR aplicados ao diagnóstico de COVID-19.

[014]. Os documentos relacionados são em maioria referente à produção, uso de proteínas recombinantes aplicação em diagnósticos para SARS-CoV-2. Algumas proteínas exploradas como antígenos para SARS-CoV-2 foram: a proteína S especificamente a região RBD (*receptor binding doming*) do vírus (RU0002723008, CN111303279, EP3715847), proteína N (CN11474345) e a fusão da proteína N com a proteína S (CN111638332A).

[015]. Portanto, devido às limitações das técnicas moleculares, os testes sorológicos, mais especificamente utilizando ELISA com antígenos peptídicos, se torna uma opção promissora ainda não explorada.

Descrição da abordagem do problema técnico

[016]. Diagnóstico laboratorial e clínico deve ocorrer simultaneamente para dar maior rapidez aos resultados. As técnicas de diagnósticos em estágios iniciais da doença e são mais onerosas e de menor acessibilidade quando comparadas a testes sorológicos. Além

disso, estas técnicas apresentam limitações quanto ao uso em cenários onde são visados testagem em larga escala (testagem em massa) incluindo casos assintomáticos, ou possibilidade de atender a grande demanda utilizando uma opção menos onerosa de testagem. Nestas situações os testes sorológicos, avaliando principalmente anticorpos IgG, se destacam devido a possibilidade de teste durante um longo período pós-sintomas ou até mesmo em casos assintomáticos. A opção mais explorada para testes sorológicos tem sido os testes imunocromatográficos devido serem do tipo *point-of-care*, permitindo obter resultados rápidos com praticidade. Porém, são de alto custo e podem apresentar alta variabilidade na especificidade e sensibilidade, o que implicam em diagnósticos falso-negativos. Por outro lado, os testes sorológicos pela técnica ELISA suprem as limitações apresentadas das outras técnicas quando aplicadas nestas situações, além de ser uma técnica bem consolidada, bem difundida entre laboratórios de diagnóstico e passível de automação.

[017]. Os testes sorológicos apresentam uma variedade de possíveis antígenos a serem empregados, os quais refletem diretamente na especificidade alcançada pelo teste. Na presente invenção os inventores realizaram um amplo estudo sobre os epítopos lineares da proteína S de SARS-COV-2, um total de 316 peptídeos sintéticos foram testados, identificando 9 peptídeos na primeira seleção com soro dos pacientes com COVID-19.

[018]. Subsequentemente, estes peptídeos foram avaliados quanto à sua eficácia de diagnóstico com um painel de soros do pacientes com COVID-19; com base nos sinais clínicos e testes auxiliares positivos para COVID-19, os Inventores definiram dois níveis de critérios a serem aplicados para selecionar o(s) peptídeo(s) mais apropriado(s) para o diagnóstico de COVID-19 (ver Exemplos), depois selecionado um peptídeo específico P.SC2.S.203 (SEQ NO 1), e conceberam um teste de

diagnóstico melhorado que permite um diagnóstico muito preciso e sensível do SARS-COV-2 causador do COVID-19.

[019]. Os inventores demonstraram que um teste ELISA indireto usando os peptídeos P.SC2.S.203 pode discriminar soros positivos de soros negativos para a COVID-19. Os parâmetros diagnósticos obtidos neste teste demonstram uma boa eficácia quando levados para os cenários clínicos (ver exemplos).

[020]. Consequentemente, a presente invenção fornece um método de utilização deste peptídeo para a detecção de anticorpos anti-SARS-COV-2 presentes no soro de doentes com COVID-19 provocada pela infecção do vírus SARS-COV-2.

[021]. A presente invenção fornece ainda um kit de diagnóstico que inclui o peptídeo da SEQ. ID. No 1, sendo o referido kit útil para detectar anticorpos anti-SARS-COV-2 presentes no soro de doentes com COVID-19 provocada pela infecção do vírus SARS-COV-2.

[022]. Os parâmetros do método de diagnóstico de acordo com a presente invenção quando aplicado ao sorodiagnóstico do COVID-19 demonstraram ser comparáveis aos obtidos para a PCR em termos de sensibilidade (S) e valor preditivo positivo (PPV) (SKITTRALL *et al.*, 2020). O método aqui descrito se torna comparável ou ainda melhores que os resultados de diagnóstico já descritos (WANG, Hongyu *et al.*, 2020). Considerando a facilidade de fabricar peptídeos sintéticos, em comparação com proteínas recombinantes, a presente invenção permite o desenvolvimento de novos reagentes de diagnóstico serológico a baixo custo e passível de ser submetido a uma avaliação de controle de qualidade.

Definições

[023]. Amostra biológica: A definição engloba sangue e outras amostras líquidas de origem biológica, amostras de tecidos sólidos, tais como uma amostra de biopsia ou culturas de tecidos ou células deles

derivadas. O termo "amostra biológica" engloba uma amostra clínica, e também inclui células em cultura, sobrenadantes celulares, lizados celulares, soro, plasma, fluido biológico, e amostras de tecidos.

[024]. Kappa é uma medida de concordância e assume o valor zero se não houver mais concordância entre o teste e o resultado, então pode ser esperado com base no acaso. Kappa assume o valor 1 se houver acordo perfeito; ou seja, o teste prevê sempre corretamente o resultado. Considera-se que os valores Kappa inferiores a 0,4 representam uma má concordância, valores entre 0,4 e 0,75 de justa a boa concordância, e valores superiores a 0,75 de excelente concordância. A Kappa negativa indica um problema na aplicação do teste. Kappa depende não só da qualidade do teste, ou seja, do interior da tabela, mas também da prevalência da doença na população em que o teste é aplicado, kappa é também sensível à distribuição dos casos na margem da tabela. Basicamente, o que Kappa mostra é que para a mesma sensibilidade e especificidade, a concordância entre o teste e o resultado irá diminuir com uma prevalência decrescente. Em termos de Kappa, um teste terá um desempenho pior em populações de baixa prevalência. Modo de Cálculo:

$$Kappa = \frac{(Valor\ observado\ de\ acordo\ - Valor\ esperado\ de\ acordo)}{1 - Valor\ esperado\ de\ acordo}$$

[025]. Sensibilidade (S): é a probabilidade de que um indivíduo que está doente seja de fato testado como doente. O nível de sensibilidade a aplicar num teste de diagnóstico é definido tendo em conta a gravidade da "doença" e o custo e disponibilidade do tratamento. Ou seja, a sensibilidade de um teste deve ser elevada se a "doença" for relativamente grave e a "cura" for relativamente barata e facilmente disponível.

[026]. Especificidade (E): é a probabilidade de um indivíduo que não está doente ser testado como não estando doente. O nível de especificidade é normalmente elevado se a doença não for tão grave

e a "cura" for relativamente cara em dinheiro e outros termos. Com as amostras detalhadas no exemplo 1, procedemos à avaliação da sensibilidade e especificidade com as condições padronizadas do teste desenvolvido na presente investigação.

[027]. J de Youden: este parâmetro é utilizado para estudar o desempenho global de um teste; assume o valor 1 se um teste de diagnóstico discriminar perfeitamente e sem cometer quaisquer erros. Como consequência, se o objetivo é minimizar a probabilidade de cometer um erro, o parâmetro J de Youden tem de ser maximizado. Naturalmente, é apenas de importância teórica, tais decisões devem ser tomadas com base numa análise custo-benefício do tratamento em vez de não haver tratamento. Exatidão preditiva positiva: numa tabela representativa da população, este parâmetro dá: 1) a probabilidade pós-teste, a probabilidade para um indivíduo da população que testou positivo de ter a doença; 2) dos que testaram positivo as frações que foram corretamente e que não foram classificadas corretamente. Exatidão preditiva negativa: numa tabela representativa da população, este parâmetro dá: 1) a probabilidade pós-teste, a probabilidade para um indivíduo na população que testou negativo de não ter a doença; 2) dos que testaram negativo as frações que foram classificadas corretamente e que não foram classificadas incorretamente.

Descrição detalhada da Invenção

[028]. A presente invenção permite o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico laboratorial que podem ser aplicadas em ambientes de saúde primária que utilizam o diagnóstico por ensaioimunoenzimático (ELISA) para diagnóstico de rotina.

[029]. Um primeiro objeto da presente invenção é um método de diagnóstico in vitro para a detecção da presença ou ausência de anticorpos contra SARS-COV-2 responsável pelo COVID-19, que se liga a

um peptídeo P.SC2.S.203 (SEQ. ID No 1) para formar um complexo imunológico, compreendendo as etapas de:

a) Contato do referido peptídeo P.SC2.S.203 (SEQ. ID No 1) com uma amostra biológica por um determinado tempo e sob condições suficientes para formar um complexo imunológico; e

b) Detectação da presença ou ausência do complexo imunológico formado em a).

[030]. A sequência do peptídeo utilizado no método de diagnóstico (MERRIFIELD, 1963) de acordo com a presente invenção são: Cod. SEQ. ID No 1 - P.SC2.S.203; SEQ. ID No 2 - P.SC2.S.130; SEQ. ID No 3 - P.SC2.S.131; SEQ. ID No 4 - P.SC2.S.137; SEQ. ID No 5 - P.SC2.S.136; SEQ. ID No 6 - P.SC2.S.138; SEQ. ID No 7 - P.SC2.S.202; SEQ. ID No 8 - P.SC2.S.204; SEQ. ID No 9 - P.SC2.S.205.

[031]. Estes peptídeos foram identificados a partir da anotação desta proteína (QIG55994) no genoma de SARS-CoV-2 (MT126808.1) sequenciado em indivíduos diagnosticados com COVID-19, no Brasil, com o método descrito nos exemplos a seguir. Os peptídeos podem ser preparados e isolados por técnicas bem conhecidas do estado da arte, como a síntese em fase sólida (MERRIFIELD, 1963).

[032]. Este peptídeo pode ser apresentado em solução; opcionalmente, ele pode ser imobilizado em um suporte apropriado como o formato de fluxo lateral ou para imunoeletroquimica. No dispositivo de fluxo lateral, o peptídeo de diagnóstico é imobilizado na membrana, tal como um fluoreto de polivinilideno, uma membrana de nitrocelulose, mas não se limitando a estes. No dispositivo de imunoelectroquimica o peptídeo é imobilizado em uma superfície condutora como eletrodo do grafeno, mas não se limitando a este elemento químico.

[033]. Para fins de detecção, o anti-humano imunoglobulina M (anti-human-IgM), anti-humano imunoglobulina A (anti-human-IgA),

anti-humano imunoglobulina G (anti-human-IgG) rotulado com um gerador de sinais (cromógeno de substrato ou ouro coloidal) é depositado em uma tira de fibra de vidro (almofada de aplicação da amostra); quando uma solução de soro a ser testada é aplicada na almofada, dissolve o molécula repórter se liga a todos os anticorpos da amostra. Esta mistura é então transportada por capilaridade (princípio cromatográfico) para a membrana seguinte contendo o peptídeo diagnóstico.

[034]. Se estiverem presentes anticorpos contra o peptídeo diagnóstico, estes se ligam ao peptídeo diagnóstico riscado na membrana gerando um sinal. Um anticorpo adicional específico do anticorpo com rótulo coloidal é utilizado para produzir um sinal de controlo.

[035]. Deve ser implícito por um dos especialistas na arte, que quaisquer formatos convencionais de ensaio de proteínas, particularmente formatos de imunoensaio, podem ser concebidos para utilizar o peptídeo aqui selecionado para a detecção da infecção por SARS-CoV-2. Esta invenção não é assim limitada pela seleção do formato de ensaio particular, e acredita-se que abrange formatos de ensaio que são conhecidos por aqueles de perícia na arte.

[036]. Os reagentes para o teste ELISA ou outros ensaios de imunodetecção podem ser fornecidos sob a forma de kits. O kit contém um peptídeo (antígeno) em meios adequados para preparar tais misturas, e/ou reagentes para a detecção do complexo peptídeo-anticorpo. Uma "amostra biológica" engloba uma variedade de tipos de amostras obtidas de um indivíduo e pode ser utilizada num ensaio de diagnóstico ou monitoramento da doença.

[037]. A técnica mais comum para realizar a etapa b) é o ensaio ELISA. Envolve pelo menos um anticorpo com especificidade para um determinado antígeno. No nosso caso o peptídeo imobilizado num

suporte sólido (geralmente uma placa de microtitulação de poliestireno ou um strip) por adsorção à superfície (ELISA indireto) ou mais especificamente (por captura por outro anticorpo específico para o mesmo antígeno, numa "sanduíche" ELISA). O anticorpo de detecção (a amostra) é adicionado, formando um complexo com o peptídeo. O anticorpo de detecção pode ser ligado covalentemente a uma enzima, ou pode ele próprio ser detectado por um anticorpo secundário que está ligado a uma enzima através da bioconjugação. Entre cada passo, a placa é normalmente lavada com uma solução detergente suave para remover quaisquer proteínas ou anticorpos que não estejam especificamente ligados. Após a etapa final de lavagem, a placa é desenvolvida pela adição de um substrato enzimático para produzir um sinal visível, que indica a quantidade de antígeno na amostra.

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

EXEMPLO 1 - IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS IMUNODOMINANTES DE PROTEINA S DO VIRUS SARS-CoV-2

1. Soros Humanos

[039].As amostras de soro utilizadas foram divididas em dois grupos:

Grupo I: Soro de 35 pacientes com sorologia positiva para SARS-CoV-2 (aprovado em comitê de ética nº 3.954.835) foram obtidos do banco de soros do Laboratório de Biologia Molecular, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia,

Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil. Todas as amostras foram reativas a pelo menos um teste laboratorial convencional para SARS-CoV-2, Fluxo lateral, RT-qPCR. Foi feito um pool dos soros positivos para o mapeamento de epítopos da Proteína S mediante a metodologia de *spot synthesis*.

Grupo II: Soro de 32 pessoas recolhidos antes do início da pandemia (comitê de ética nº 3.954.835). Estas amostras individualmente foram testadas contra os nove peptídeos sintéticos selecionados.

2. Mapeamento do epítopos antigênicos

[040]. Para o mapeamento epítopos, foi utilizada uma biblioteca de peptídeos sobrepostos cobrindo toda a sequência da proteína S do vírus SARS-CoV-2. O rastreio foi realizado com um pool de soros positivos detalhado anteriormente.

[041]. Os peptídeos foram sintetizados quimicamente pelo método sintético de fase sólida em membrana de celulosa (amino-PEG membrane) com a química fluorenilmetiloxicarbonil (F-moc) (HILPERT; WINKLER; HANCOCK, 2007). Os peptídeos sobrepostos por quatro aminoácidos para Proteína S permitiram encontrar um total de 316 peptídeos. Todos os peptídeos continham 15-mer de comprimento.

[042]. Para o ensaio de imunodetecção, a membrana de celulose foi primeiramente bloqueada, para ligação não específica, por agitação *overnight* com caseína 3% (p/v) e sacarose 0,5% (p/v) em TBS-T (0,1% Tween 20 (v/v) em TBS) a 4°C. Depois, a membrana foi lavada com TBS-T durante 10 min sob agitação constante. Foi adicionado soro diluído 1:100 em tampão de bloqueio (3% (p/v) caseína, 0,5% (p/v) sacarose e TBS-T 0,1%) e incubado durante 90 min a 37°C. A membrana foi lavada novamente e incubada com anticorpo secundário marcado com biotina (1:30.000) diluído em tampão de bloqueio durante 60 min a 37°C, seguido de uma etapa de incubação com estreptavidina

(1:10.000) diluída em tampão de bloqueio durante 60 min a 37°C. Após duas lavagens, pontos positivos foram visualizados pelo sistema ECL™ (Figura 1) que foram selecionados nove *Spots* que tiveram uma intensidade mais elevada após a revelação da ECL e que não cruzaram a reação com soro negativo. As seguintes sequências foram selecionadas: P.SC2.S.203 (SEQ NO 1), P.SC2.S.130 (SEQ NO 2), P.SC2.S.131 (SEQ NO 3), P.SC2.S. 137 (SEQ NO 4) P.SC2.S.136 (SEQ NO 5), P.SC2.S.138 (SEQ NO 6), P.SC2.S.202 (SEQ NO 7), P.SC2.S.204 (SEQ NO 8) e P.SC2.S.205 (SEQ NO 9).

EXEMPLO 2 - AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS IN SÍLICO E SÍNTESES

[043]. A análise *in sílico* das sequências, referente a presente invenção, foi feita quanto à similaridade em termos de "cobertura" (*query cover*) e "identidade" na ferramenta BLASTp. A sequência exata (cobertura e identidade ambas 100%) não foi encontrada ser semelhante a sequências patenteadas (*database Patented Protein Sequence*) ou as dos seguintes organismos: vírus H1N1 (taxid:114727); coronavírus 229E (taxid:11137); coronavírus NL63 (taxid:277944); Human coronavirus (strain OC43) (taxid:31631); Coronavirus HKU15 (taxid:1965089); humanas (taxid:9606) (ALTSCHUL, 1997). Além do analises da similaridade e identidade foi feito um estudo de antigenicidade para o desenvolvimento do anticorpos pelo linfócitos B dos peptídeos selecionado fazendo uso das ferramentas como BepiPred-2.0 (GALGONEK *et al.*, 2017), BcePred (SAHA; RAGHAVA, 2004), IEDB (FLERI *et al.*, 2017) e o software DNASTAR (Lasergene 14.1) (Tabela 1).

Tabela 1. Predição da antigenicidade dos epítopos selecionados por diferentes metodologias.

Cod.	SEQ.ID	BepiPred-2.0	BcePred	IEDB	DNASTAR
P.SC2.S.203	SEQ. ID No 1	0,33	0,20	0,33	0,87

P.SC2.S.130	SEQ. ID No 2	0,71	0,13	0,83	1,68
P.SC2.S.131	SEQ. ID No 3	0,71	0,17	0,72	1,59
P.SC2.S.137	SEQ. ID No 4	0,18	0,10	0,20	0,48
P.SC2.S.136	SEQ. ID No 5	0,02	0,03	0,13	0,19
P.SC2.S.138	SEQ. ID No 6	0,29	0,13	0,23	0,66
P.SC2.S.202	SEQ. ID No 7	0,47	0,20	0,33	1,00
P.SC2.S.204	SEQ. ID No 8	0,22	0,10	0,27	0,59
P.SC2.S.205	SEQ. ID No 9	0,24	0,02	0,27	0,53

[044]. Os peptídeos foram sintetizados quimicamente em equipamento automatizado MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments) pela técnica de síntese em suporte sólido utilizando aminoácidos com grupos de proteção F-moc (HILPERT; WINKLER; HANCOCK, 2007). Após síntese, este foi purificado com solvente éter ter-butil-metil e quantificado utilizando kit Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) para posterior uso como antígenos.

EXEMPLO 3: REATIVIDADE E PADRONIZAÇÃO DOS NOVOS PEPTÍDEOS EM TESTE ELISA DETECTANDO ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2

[045]. A avaliações dos peptídeos como antígeno específico para SARS-CoV-2 foi realiazada pela técnica de ELISA. Foram avaliados os seguintes parâmetros: concentrações dos peptídeos (antígeno); concentração de solução tampão de bloqueio; diluição da amostra biológica; diluição da solução de anticorpo conjugado anti-human-IgG, anti-human-IgM anti-human-IgA com peroxidase ou biotina; diluição de proteína conjugada neutravidina com peroxidase.

[046]. Para realização a padronização dos testes os peptídeos são imobilizados em um suporte sólido com diferentes concentrações dos diferentes peptídeos (10 a 120 ng/poço) fazendo uso do tampão carbonato 0.05 M (pH 9.6). Os suportes sólidos incluem microplacas de

96 ou 384 poços, que podem ser de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno ou poliestireno, mas não se restringindo a estas.

[047]. Em seguida, é adicionada ao suporte sólido uma amostra de fluido biológico (sangue, soro, plasma, saliva, urina ou lágrima), fazendo uso do grupo I como amostra positivas e grupo II como amostras negativas diluídas em a faixa 1:50 a 1:400 e são incubadas a 37ºC por uma hora.

[048]. Moléculas que não interajam especificamente com o antígeno imobilizado aos suportes são removidas por lavagem com solução de lavagem (NaCl 0.5-1.5% (m/v) e Tween 20 0,02-0.1% (v/v)) na concentração 1x.

[049]. Em seguida, um anticorpo secundário (anti-human IgM, anti-human IgA e/ou anti-human IgG) marcado com biotina, fluoróforo ou a conjugado com uma enzima (peroxidase, ou fosfatase alcalina) são diluídos na solução de incubação em um faixa de 1:5000 a 1:25000 e adicionados aos poços formado o complexo antígeno anticorpo primário e anticorpo secundário e são incubadas a 37ºC por uma hora. O suporte sólido é então lavado novamente com solução de lavagem 1x, para a remoção de anticorpos não ligados.

[050]. No caso do uso de anticorpo conjugado com biotina é necessário adicionar uma molécula conjugada como uma enzima peroxidase ou fosfatase alcalina) podendo ser usado Neutravidina, Estreptavidina e Avidina , os quais são diluídos na solução de incubação em um faixa de 1:5000 a 1:25000 e adicionados aos poços e são incubadas a 37ºC por uma hora. O suporte sólido é então lavado novamente com solução de lavagem 1x, para a remoção de anticorpos não ligados.

[051]. A etapa seguinte do processo de diagnóstico consiste, portanto na adição de solução de revelação nos poços incubar de 15 a 30 min a temperatura ambiente, seguida de adição de solução de

parada (stop). O sinal emitido após a adição dos substratos enzimáticos pode ser colorimétrico, quimioluminescente ou fluorescente, e a quantificação deste sinal indica a presença ou não de anticorpos anti-COVID-19. Os resultados da padronização para os diferentes peptídeos são mostrados na figura 2 para IgM, IgA e IgG, na figura 3 para IgM e na figura 4 para IgG. O peptídeo P.SC2.S.203 se mostrou com melhores resultados para o diagnóstico de COVID-19.

Exemplo 4: Validação do uso do novo antígeno P.SC2.S.203 usando o teste ELISA frente a soro de pacientes diagnosticados com COVID-19 detectando anticorpos IgM e IgG

[052]. A determinação dos índices Kappa, J de Youden, a sensibilidade e a especificidade foram determinadas com as amostras detalhadas no exemplo 1 ou seja 35 soros de pacientes comprovadamente positivos para Sars-Cov-2 e 32 soros negativos (colhidos antes da pandemia).

[053]. Os parâmetros de diagnóstico utilizados para descrever a exatidão do teste de diagnóstico foram calculados; incluíram: exatidão do teste: número e proporção de todas as observações da tabela que foram classificadas corretamente pelo teste de curva ROC e teste kappa: este parâmetro assume o valor 1 se houver perfeita concordância; ou seja, o teste prevê sempre corretamente o resultado (1 perfeito, >0,75 excelente, 0,4-0,75 justo, <0,4 mau.

[054]. A avaliação dos parâmetros mencionados mostrou que o peptídeo reivindicado apresentou índice Kappa com excelente concordância, índice de Youden mostra que o antígeno discrimina perfeitamente os resultados entre doentes e não doentes, a sensibilidade para detectar a doença na fase aguda foi de 91,67% com 100.00% de especificidade. Para a doença em fase crônica a especificidade foi de 81,25% e a sensibilidade de 86,97% (tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros testado para a validação do peptídeo P.SC2.S.203 para seu uso no diagnostico

Parâmetro	IgM	IgG
Kappa	0,84	0,86
J de Youden	0,92	0,68
Especificidade	100.00	81,25
Sensibilidade	91,67	86,96

Descrição das Figuras:

[055]. Figura 1 –. Detecção imunológica de domínios antigênicos em membrana pela técnica do *Spot Synthesis*. É mostrada a membrana de nitrocelulose com 316 *Spots*. Os pontos mais brilhantes são os domínios antigênicos que foram detectados pela exposição da membrana ao soro de pacientes com COVID e revelados pela interação do antígeno/anticorpo ligado à enzima peroxidase, que reagirá com o *enhanced chemiluminescence* (ECL).

[056]. Figura 2 – Proporção e diferença entre valores de absorbância obtidos na padronização das condições do teste ELISA utilizando os nove peptídeos frente a pool de soros positivos e soros negativos para o conjugado anti-human-IgA, anti-human-IgM e anti-human-IgG. Onde o eixo y do lado esquerdo mede a absorbância das amostras e sua diferença. O eixo y do lado direito mostra a relação de absorção entre as amostras positivas com a negativas, todos os peptídeos testados mostraram uma relação maior que 2 vezes o valor de absorção da amostra negativa.

[057]. Figura 3 – Proporção e diferença entre valores de absorbância obtidos na padronização das condições do teste ELISA utilizando os peptídeos frente a pool de soros positivos e negativos para

o conjugado anti-human-IgM. Onde o eixo y do lado esquerdo mede a absorbância das amostras e sua diferença. O eixo y do lado direito mostra a relação de absorção entre as amostras positivas com a negativas, todos os peptídeos testados mostraram uma relação maior que 2 vezes o valor de absorção da amostra negativa.

[058]. Figura 4 – Proporção e diferença entre valores de absorbância obtidos na padronização das condições do teste ELISA utilizando os peptídeos frente a pool de soros positivos e negativos para o conjugado anti-human-IgG. Onde o eixo y do lado esquerdo mede a absorbância das amostras e sua diferença. O eixo y do lado direito mostra a relação de absorção entre as amostras positivas com a negativas, todos os peptídeos testados mostraram uma relação maior que 2 vezes o valor de absorção da amostra negativa.

[059]. Figura 5 – Curva ROC (*receiver operator characteristic curve*) onde aponta a sensibilidade e especificidade do ELISA com anti-human-IgM, contendo o antígeno P.SC2.S.203 para detecção de COVID-19. A metodologia para detectar e diagnosticar a doença na fase aguda foi de 91,67% e sensibilidade e com 100% de especificidade.

[060]. Figura 6 – Curva ROC onde aponta a sensibilidade e especificidade do ELISA com anti-human-IgG, contendo o antígeno P.SC2.S.203 para detecção de COVID-19. A metodologia pode detectar e diagnósticar a doença na fase crônica, a especificidade foi de 81,25% e a sensibilidade de 86,97%.

Referências

[061]. ALTSCHUL, S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997. DOI 10.1093/nar/25.17.3389. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/25.17.3389.

[062]. CHAN, Jasper Fuk-Woo *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 1 jan. 2020. DOI 10.1080/22221751.2020.1719902. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1719902.

[063]. CHAN, Kui K. *et al.* Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. **Science**, v. 369, n. 6508, p. 1261–1265, 4 set. 2020. DOI 10.1126/science.abc0870. Disponível em: https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.abc0870.

[064]. CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2 abr. 2020. DOI 10.1038/s41564-020-0695-z. Disponível em: http://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z.

[065]. FLERI, Ward *et al.* The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 14 mar. 2017. DOI 10.3389/fimmu.2017.00278. Disponível em: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00278/full.

[066]. GALGONEK, Jakub *et al.* Amino Acid Interaction (INTAA) web server. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W388–W392, 3 jul.

2017. DOI 10.1093/nar/gkx352. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkx352.

[067]. 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, 30 abr. 2020. DOI 10.1056/NEJMoa2002032. Disponível em: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2002032.

[068]. HILPERT, Kai; WINKLER, Dirk F H; HANCOCK, Robert E W. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1333, 24 maio 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nprot.2007.160.

[069]. HOSSEINI, Samira *et al.* **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): From A to Z**. [s.l.: s.n.], 2018. Disponível em: http://www.springer.com/series/11910.

[070]. HU, Ben *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, 6 out. 2020. DOI 10.1038/s41579-020-00459-7. Disponível em: http://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7.

JIANG, He-wei *et al.* SARS-CoV-2 proteome microarray for global profiling of COVID-19 specific IgG and IgM responses. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3581, 14 dez. 2020. DOI 10.1038/s41467-020-17488-8. Disponível em: http://www.nature.com/articles/s41467-020-17488-8.

[071]. KONTOU, Panagiota I. *et al.* Antibody Tests in Detecting SARS-CoV-2 Infection: A Meta-Analysis. **Diagnostics**, v. 10, n. 5, p. 319, 19 maio 2020. DOI 10.3390/diagnostics10050319. Disponível em: https://www.mdpi.com/2075-4418/10/5/319.

[072]. LI, Xiaowei *et al.* Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 2, p. 102–108, abr. 2020. DOI 10.1016/j.jpha.2020.03.001. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177920302045.

[073]. LIU, Wanbing *et al.* Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 6, 30 mar. 2020. DOI 10.1128/JCM.00461-20. Disponível em: http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00461-20.

[074]. 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, jul. 1963. DOI 10.1021/ja00897a025. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00897a025.

[075]. ONG, D.S.Y. *et al.* Comparison of diagnostic accuracies of rapid serological tests and ELISA to molecular diagnostics in patients with suspected coronavirus disease 2019 presenting to the hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 8, p. 1094.e7-1094.e10, ago. 2020. DOI 10.1016/j.cmi.2020.05.028. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X20303050.

[076]. PASCARELLA, Giuseppe *et al.* COVID□19 diagnosis and management: a comprehensive review. **Journal of Internal Medicine**, v. 288, n. 2, p. 192–206, 13 ago. 2020. DOI 10.1111/joim.13091. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.13091.

[077]. ROTHAN, Hussin A.; BYRAREDDY, Siddappa N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. **Journal of Autoimmunity**, v. 109, p. 102433, maio 2020. DOI 10.1016/j.jaut.2020.102433. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841120300469.

[078]. SAHA, Sudipto; RAGHAVA, G. P. S. BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. [s.l.: s.n.], 2004. p. 197–204. DOI 10.1007/978-3-540-30220-9_16. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-30220-9_16.

[079]. SETHURAMAN, Nandini *et al.* Interpreting Diagnostic Tests for

SARS-CoV-2. **JAMA**, v. 2019, p. 2019–2020, 2020. DOI 10.1001/jama.2020.8259. .

[080]. SKITTRALL, Jordan P. *et al.* Specificity and positive predictive value of SARS-CoV-2 nucleic acid amplification testing in a low-prevalence setting. **Clinical Microbiology and Infection**, out. 2020. DOI 10.1016/j.cmi.2020.10.003. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X20306145.

[081]. VAN REGENMORTEL, M.H.V. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. **Biologicals**, v. 29, n. 3–4, p. 209–213, set. 2001. DOI 10.1006/biol.2001.0308. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105601903082.

[082]. WANG, Hongye *et al.* SARS-CoV-2 Proteome Microarray for Mapping COVID-19 Antibody Interactions at Amino Acid Resolution. **ACS Central Science**, p. acscentsci.0c00742, 21 out. 2020. DOI 10.1021/acscentsci.0c00742. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.0c00742.

[083]. WANG, Hongyu *et al.* Meta-analysis of diagnostic performance of serology tests for COVID-19: impact of assay design and post-symptom-onset intervals. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 2200–2211, 1 jan. 2020. DOI 10.1080/22221751.2020.1826362. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1826362.

[084]. 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, 11 jun. 2020. DOI 10.1002/jmv.25721. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25721.

[085]. WHO - R&D BLUEPRINT. COVID-19 Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.0.1. n. July, p. 1–38, 2020. Disponível em:

https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-target-product-profiles-for-priority-diagnostics-to-support-response-to-the-covid-19-pandemic-v.0.1.

[086]. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Coronavirus Disease Coronavirus Disease (COVID-19) Spreads. **Who**, v. 75, n. 2, p. 95–97, 2020. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200423-sitrep-94-covid-19.pdf.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteínas ou peptídeos caracterizados por consistir de uma ou mais das seguintes sequências de aminoácidos: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 e SEQ ID NO. 9, a serem usados individualmente ou em associação, ou em proteínas quiméricas.
2. Método de diagnóstico *in vitro* caracterizado por compreender as etapas de:

   a) contato de proteínas ou peptídeos, de acordo com a reivindicação 1, com amostra biológica para formar um complexo imune;

   b) detecção da presença ou ausência do complexo imune formado.
3. Kit de diagnóstico de imunoensaio para determinar o conteúdo total e/ou separado de imunoglobulinas M, G, ou A contra o Vírus SARS-CoV-2, de acordo com a reivindicação 2, caraterizado por conter antígenos de acordo com a reinvindicação 1, tampão de lavagem, tampão de incubação, anticorpo secundário, solução reveladora, solução de parada.
4. Kit de diagnóstico de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo uso de proteínas ou peptídeos, de acordo com a reivindicação 1, na concentração de 10 a 1000 ng dependendo do antígeno a ser usado, e bloqueados com solução de soro albumina bovina (BSA) de 1 a 5 % (m/v) em um suporte sólido.
5. KIT de diagnóstico, de acordo com as reivindicações 3 e 4, caracterizado por ser o suporte sólido: nitrocelulose, polipropileno, poliestireno ou grafeno.
6. KIT de diagnóstico, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por conter tampão de lavagem concentrado 5x, composto de NaCl em concentração de 15% (m/v) contendo

Tween 20 em concentração 05% (m/v), conforme o antígeno a ser usado.

7. KIT de diagnóstico, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por conter tampão de incubação concentrado 15x, composto de solução de caseína (1 a 5,0% m/v) em tampão PBS pH 7,4.
8. KIT de diagnóstico, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por conter anticorpo secundário conjugado a uma enzima peroxidase *Hourse radish peroxidase* (HRP) ou marcador.
9. KIT de diagnóstico, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato do marcador ser um radioisótopo, biotina, cromóforo, fluoróforo ou substância quimioluminescente.
10. KIT de diagnóstico, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por conter solução substrato cromógeno.
11. KIT de diagnóstico, de acordo com as reivindicações 3 e 10, caracterizado por conter solução substrato cromógeno ser TMB (5,5'-tetrametilbenzidina), OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride).
12. KIT de diagnóstico, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por conter solução de parada composta de solução 3 a 6 M de HCl e H_2SO_4.

FIGURAS

Figura 1

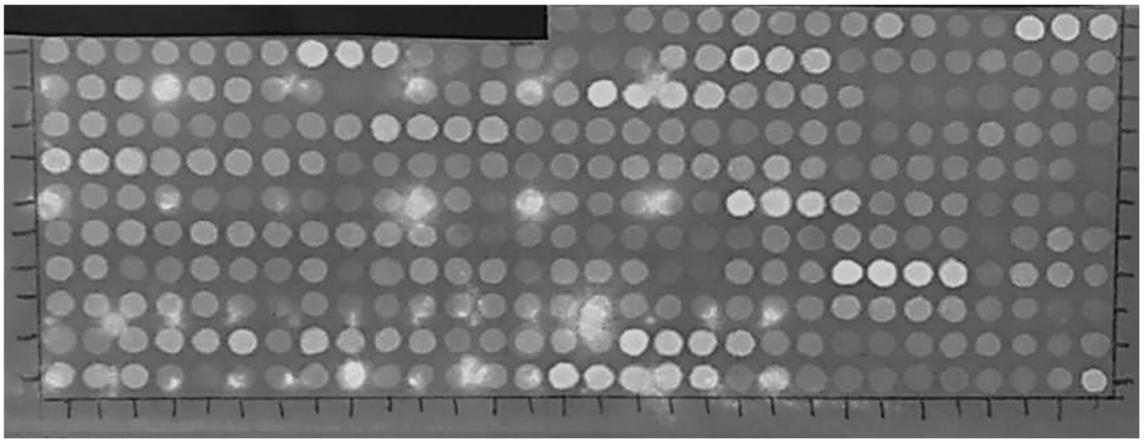


Figura 2

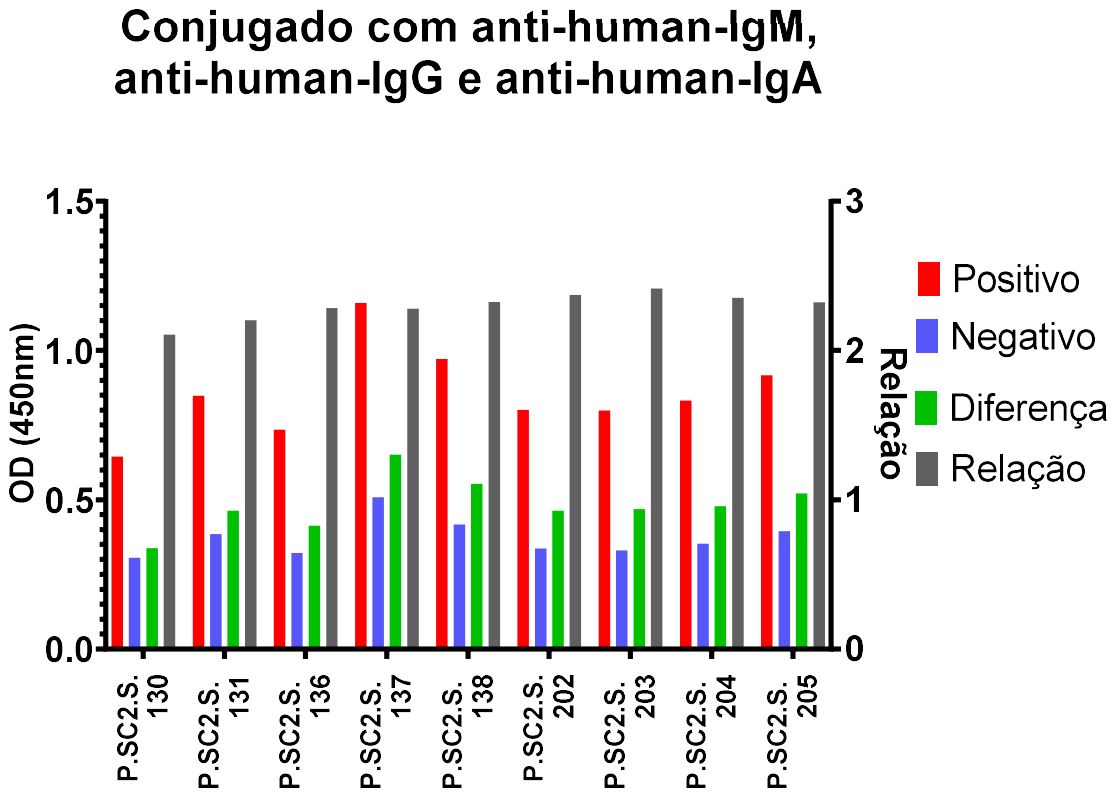

Conjugado com anti-human-IgM, anti-human-IgG e anti-human-IgA
OD (450nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
Relação
3
2
1
0
Positivo
Negativo
Diferença
Relação
P.SC2.S. 130
P.SC2.S. 131
P.SC2.S. 136
P.SC2.S. 137
P.SC2.S. 138
P.SC2.S. 202
P.SC2.S. 203
P.SC2.S. 204
P.SC2.S. 205

Figura 3

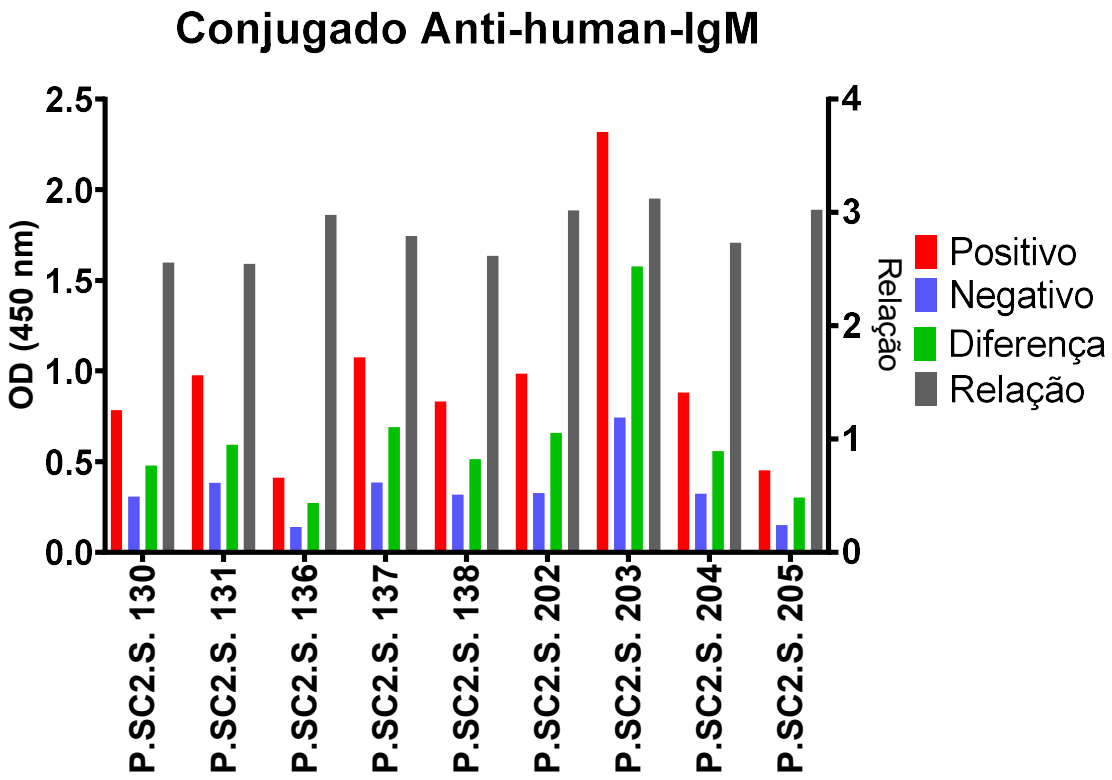
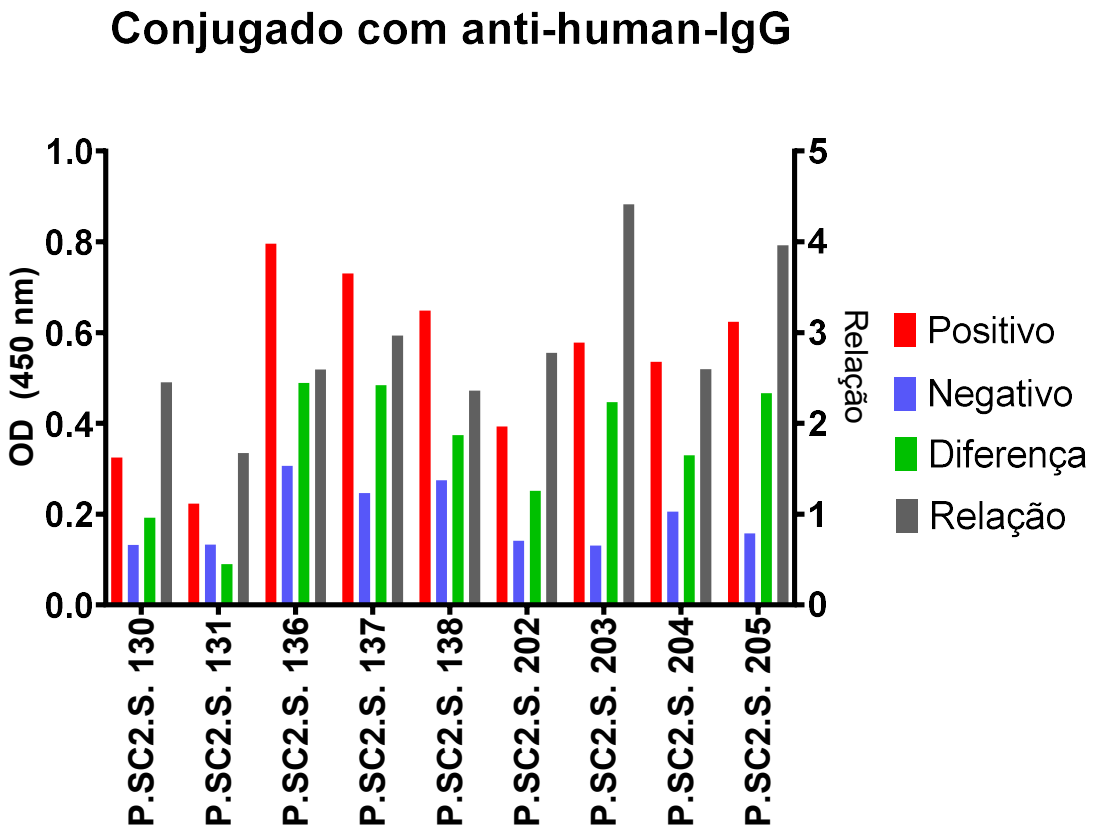

Conjugado Anti-human-IgM
OD (450 nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
4
3
2
1
0
Relação
Positivo
Negativo
Diferença
Relação
P.SC2.S. 130
P.SC2.S. 131
P.SC2.S. 136
P.SC2.S. 137
P.SC2.S. 138
P.SC2.S. 202
P.SC2.S. 203
P.SC2.S. 204
P.SC2.S. 205

Figura 4


Conjugado com anti-human-IgG
OD (450 nm)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Relação
5
4
3
2
1
0
P.SC2.S. 130
P.SC2.S. 131
P.SC2.S. 136
P.SC2.S. 137
P.SC2.S. 138
P.SC2.S. 202
P.SC2.S. 203
P.SC2.S. 204
P.SC2.S. 205
Positivo
Negativo
Diferença
Relação