



IPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
**Assinado
Digitalmente**

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

CARTA PATENTE Nº BR 102017022744-8

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 102017022744-8

(22) Data do Depósito: 23/10/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 07/05/2019

(51) Classificação Internacional: C07K 14/44; A61K 39/008; C12N 15/30; G01N 33/569.

(54) Título: ANTÍGENO RECOMBINANTE DE LEISHMANIA E MÉTODO PARA PRODUZIR O REFERIDO ANTÍGENO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2º ANDAR, CENTRO, CURITIBA, PR, BRASIL (BR), 80010-200, Brasileira

(72) Inventor: VANETE THOMAZ SOCCOL; LÍGIA MORAES BARIZON DE SOUZA; EDUARDO SCOPEL FERREIRA DA COSTA; PAUL ANDREW BATES; MICHELLE D. BATES.

Código de Controle: 81F72C112ED0B0F5 9190FA91C463C49C

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 23/10/2017, observadas as condições legais

Expedida em: 06/08/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

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



ANTÍGENO RECOMBINANTE DE LEISHMANIA E MÉTODO PARA PRODUZIR O REFERIDO ANTÍGENO

Campo da invenção

(001) A presente invenção trata de um conjunto de sequências de nucleotídeos para serem expressas em *Leishmania tarentolae* como vetor de expressão, capaz de traduzir antígenos recombinantes semelhantes a peptídeos de *Leishmania braziliensis* e/ou *Leishmania infantum*. Estes antígenos podem ser utilizados em testes de diagnóstico e na construção de agentes imunizadores contra leishmaniose.

Histórico da invenção

(002) As Leishmanioses são doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* (Trypanosomatidae). Estes parasitos são capazes de induzir resposta imunológica do hospedeiro pela constante alteração das frações antigênicas e dos mecanismos de imunossupressão. A habilidade do hospedeiro, em controlar a infecção, exige a produção de respostas imunes mediadas pelas células capazes de ativar macrófagos, que são responsáveis por eliminar os parasitos intracelulares. A eliminação do parasito é mediada por células de tipo Th1, secretoras de IFN- γ em resposta ao aumento de interleucina IL-12, já o desenvolvimento de resposta de células Th2, pode aumentar a produção de IL-4, resultando na piora das lesões e do curso da doença sistêmica. Alguns antígenos de *Leishmania* levam à diferenciação da resposta imune do hospedeiro em células T ativas, que secretam diversas citocinas, incluindo a IL-4. Estas fazem com que linfócitos-B produzam imunoglobulinas. Sabe-se que anticorpos são produzidos por

estimulação dos neutrófilos no início da infecção. No entanto, estudos sugerem que anticorpos não participam do mecanismo de proteção do hospedeiro contra o agente patogênico. Porém, são úteis na detecção de anticorpos contra o parasito (AL-QADHI, MUSA & HUMMADI, 2015; MARTINS *et al.*, 2016).

(003) O diagnóstico das leishmanioses geralmente é feito com uma combinação de vários dados como aspecto clínico, dados epidemiológicos e exames laboratoriais. Devido à falta de um teste diagnóstico com alta especificidade e sensibilidade para este grupo de doenças, o desenvolvimento de um método com estas especificações ainda precisa ser feito, devendo ser de fácil uso e barato.

Descrição do Estado da Técnica

(004) Alguns antígenos purificados a partir do extrato do parasito ou, obtidos por proteínas recombinantes de várias espécies de *Leishmania* têm sido produzidos e utilizados para ensaios sorológicos visando o diagnóstico da doença. A partir da busca de proteínas mais específicas observa-se uma melhora nas características operacionais destes testes, como é o caso da utilização do antígeno rK39 para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral (VL). O antígeno rK39 é uma proteína recombinante isolada do cinetoplasto de *Leishmania infantum*, que contem 6.5 cópias do epítipo antigênico para células-B, rearranjados em 39 aminoácidos. Este antígeno provém da proteína cinesina, presente tanto em *L. infantum* como em *L. donovani*, e possui faixa de leitura aberta singular que codifica 298 aminoácidos com massa molecular de 32.7 kDa. Esta proteína está envolvida em diversos processos intracelulares e marca presença da forma amastigota de

várias espécies de *Leishmania* (BURNS et al., 1993, BADARÓ et al., 1996, VAISH et al., 2012, MOLINET et al., 2013).

(005) Isolar proteínas antigênicas de espécies de *Leishmania* e expressar seus epítomos de forma heteróloga em sistema procarionte como *Escherichia coli* é uma técnica simples, barata e rápida. No entanto, tal técnica possui algumas limitações, tais como erros na atividade pós-tradução, especialmente na glicosilação. Da mesma forma, uma concentração alta de proteínas mal enoveladas pode levar a um declínio na eficiência da re-enovelção, bem como a realização da cultura de *E. coli* em temperatura ótima prejudica o rendimento de produção das proteínas recombinantes, estimulando a degradação das proteínas expressas (KHOW & SUNTRARACHUN, 2012). O protozoário *L. tarentolae*, não é patogênico para mamíferos e tem sido explorado como um hospedeiro eucarionte de uma plataforma para expressão de proteínas heterólogas - a *Leishmania* Expression System (LEXSY®), da empresa Jena Bioscience - que permite a expressão de proteínas complexas de eucariontes em altas concentrações e com a habilidade de produzir proteínas corretamente, mesmo após a tradução. O sistema de expressão LEXSY foi projetado para combinar síntese e modificação de proteínas eucarióticas com simplicidade e facilidade de manuseio. É utilizado, principalmente, para a expressão de proteínas de baixos rendimentos ou inativas. Outra vantagem é que os genes que codificam a proteína recombinante alvo podem ser expressos quando transcritos pela RNA polimerase I ou uma polimerase externa, uma vez que o processo do RNA não está atrelado à transcrição do DNA. Além disso, a célula hospedeira é de fácil manipulação, pode ser cultivado em meios de cultura baratos, com tempo de duplicação entre 6 e 8 horas e são tão eficientes quanto os sistemas procariontes. Por essas razões torna-se um sistema de expressão confiável para expressão de proteínas eucariontes. Finalmente, a

manutenção de uma cultura transferida de *L. tarentolae* é feita sob seleção de antibióticos específicos, mantendo o mesmo nível de expressão de proteínas por vários meses de cultura (BREITLING *et al.*, 2002; KUSHNIR *et al.*, 2011; KLATT & KONTHUR, 2012).

(006) Atualmente, as proteínas recombinantes de parasitos têm sido utilizadas para várias aplicações, como o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e vacinas, análise da estrutura e função de proteínas de parasitos e seleção e definição de possíveis drogas, imunogenicidade de produtos recombinantes e modificações pós-tradução (FERNÁNDEZ-ROBLEDO & VASTA, 2010).

(007) Devido à falta de conhecimento da forma como diferentes espécies de *Leishmania* causam diversas manifestações clínicas em mamíferos, a identificação da distribuição de genes em cada espécie pode ajudar a elucidar seus mecanismos de ação no desenvolvimento da doença. Poucos genes de espécies específicas de parasitos são considerados importantes na forma como a doença se desenvolve graças à diferente expressão gênica entre as espécies. O genoma do parasito também possui uma pequena participação na apresentação clínica. Quando se comparam os genomas das duas espécies patogênicas de *Leishmania* mais comuns no Brasil, *L. infantum*, que causa VL, e *L. braziliensis* que causa leishmaniose cutânea (LC), semelhanças têm sido encontradas, como a quantidade de genes em cada espécie (8,195 na primeira e 8,314 na segunda) e a identidade média de aminoácidos e nucleotídeos (77 e 81%, respectivamente). Entretanto, sabe-se que *L. infantum* possui 36 cromossomos contra 35 de *L. braziliensis*, devido a uma aparente fusão dos cromossomos 20 e 34. Apesar das diferenças entre os fenótipos dos parasitos, poucos genes são específicos a cada espécie: apenas 26 são exclusivos de *L. infantum* e 47 de *L. braziliensis* (PEACOCK *et al.*, 2007).

(008) Com base nos dados supracitados, o objetivo da presente patente de invenção é explorar o uso de *L. tarentolae* como hospedeira para a expressão e secreção de proteínas recombinantes relacionadas à cinesina de *L. braziliensis*, a partir da cinesina referência de *L. infantum*.

Listagem das figuras

(009) A figura 1 representa um fluxograma com as etapas que foram seguidas para chegar à proteína recombinante, alvo de proteção da presente patente de invenção, sendo que: (1) é o processo de reconstrução do plasmídeo Lbk39; (2) é a propagação e clonagem do plasmídeo Lbk39 em uma cepa de *E. coli*; (3) é a transfecção do plasmídeo Lbk39 na célula hospedeira *L. tarentolae*, pertencente à plataforma LEXSY; (4) é o cultivo de LEXSY em meio Lbk39; (5) é a confirmação da integração genômica do cassete de expressão no locus *ssu* da célula hospedeira por meio de PCR; (6) é a purificação da proteína recombinante Lbk39; (7) é o teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado com amostras clínicas coletadas em (7a). A figura 2 apresenta os níveis de anticorpos anti-Lbk39, detectados pela técnica de ensaio imunoenzimáticos (ELISA), em pacientes provenientes de regiões endêmicas e não endêmicas para LC no Brasil, comparados aos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, também detectados pela mesma técnica e pacientes. H1: Indivíduos saudáveis de regiões não endêmicas para LC; H2: Indivíduos saudáveis de regiões endêmicas para LC; LC1: pacientes com LC com lesão ativa e sem tratamento; LC2: pacientes com LC com lesão ativa sob tratamento; LC3: pacientes com LC que finalizaram o tratamento e estavam sob observação pelos 3 meses subsequentes; LV: pacientes positivos para LV; DC: pacientes soro reagentes para Doença de Chagas.

Descrição detalhada da invenção

(010) A presente invenção apresenta a construção de um antígeno heterólogo específico para detecção de indivíduos portadores leishmanioses, tanto visceral quanto cutânea, a partir de uma proteína recombinante produzida a partir de um gene relativo à cinesina de *L. infantum*. Como hospedeiro para expressão e secreção desta proteína, é usada *L. tarentolae*. Análises de similaridade revelaram um produto gênico, que denominamos de Lbk39, que exibiu 84% de identidade com o gene de referência e codifica uma proteína de 281 aminoácidos com uma massa molecular prevista de 30.2 kDa e 4 cópias idênticas com 39 aminoácidos. Depois disso, a sequência de nucleotídeos Lbk39 foi sintetizada quimicamente (SEQ ID NO: 1), inserido no vetor recombinante pLEXSY-sat2 (construído e comercializado pela empresa Jena Bioscience e que possui a codificação para resistência ao antibiótico estreptotricina acetiltransferase), clonado com um marcador 6xHis e inserido no locus 18SrRNA cromossômico de *L. tarentolae* e, por último, a proteína é secretada no meio de cultura. Este método provou-se eficiente na produção e expressão da proteína-alvo e na detecção de anticorpos de pacientes (humanos e caninos) infectados com VL e CL. Os detalhes, das etapas para produção deste antígeno são descritas nos exemplos a seguir e na figura 1. No final, obteve-se uma sequência de aminoácidos, SEQ ID NO: 2, que caracteriza o antígeno Lbk39.

Exemplos

(011) Os seguintes exemplos servem para ilustrar como foi realizada a abordagem científica para chegar à proteína recombinante a que faz referência a presente patente de invenção.

Exemplo 1: Coleta de amostras de sangue, soro e outros
fluídos corporais

(012) 108 amostras de sangue e posterior separação de soros de humanos ou caninos de diferentes faixas etárias foram coletadas das seguintes regiões de CL e VL: região endêmica do Pará e Espírito Santo e regiões endêmicas e não endêmicas do Paraná. O principal critério de inclusão para este estudo foi o diagnóstico comprovado de CL ou VL por presença do parasito na avaliação direta das lesões, obtidas das bordas da lesão ativa por biópsia e/ou presença do parasito em cultura, de acordo com a tabela 1.

Grupo	N	Classificação
H1	22	Indivíduos saudáveis de regiões não endêmicas
H2	37	Indivíduos saudáveis de regiões endêmicas
CL1	9	Pacientes com lesões ativas de CL e sem tratamento
CL2	5	Pacientes com lesões ativas de CL sob tratamento
CL3	13	Pacientes que já finalizaram tratamento para CL e que estão sob observação
CD	13	Pacientes cujo soro foi positivo para doença de Chagas
VL	5	Pacientes positivos para VL

N: número de pacientes em cada grupo

(013) Após a separação todas as amostras de soro foram congeladas a – 20 °C e – 80 °C. Indivíduos do grupo H2 foram examinados clinicamente para descartar qualquer infecção anterior de CL. Pacientes com CL e VL foram tratados de acordo com o protocolo do Ministério da Saúde do Brasil. Pacientes com outras doenças, como

Doença de Chagas foram estudados para avaliar a chance de reação cruzada nos testes.

(014) Análise por similaridade das sequências dos fragmentos clonados revelaram um produto de 843 bp do locus LBRM_14_1110 da cepa *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, exibiu 84% de identidade com o gene de *L. infantum* relativo à cinesina, codificando uma proteína de 281 aminoácidos, com uma massa molecular prevista de 30.2 kDa, com 4 cópias idênticas codificando 39 aminoácidos. Os oligonucleotídeos foram produzidos sinteticamente e foram inseridos em um vetor recombinante pLEXY-sat2 e clonados com um marcador 6xHis.

Exemplo 2: Construção do plasmídeo Lbk39

(015) O fragmento do gene relativo à cinesina de *L. braziliensis*, batizado de Lbk39, contem 843 pares de bases (bp) e é responsável por codificar as repetições de aminoácidos imunologicamente dominantes. Ele foi construído com base no gene relacionado à cinesina de *L. infantum* – Genbank: L07879, descrito por Burns *et al.* (1993) e compreende 46 aminoácidos seguidos por 6.5 repetições de 39 aminoácidos. A homologia foi realizada pela ferramenta de semelhança BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

(016) Para a expressão da proteína recombinante alvo, o gene sintético Lbk39 foi montado a partir de oligonucleotídeos sintéticos e o fragmento foi introduzido no vetor recombinante pLEXY-sat2, e clonado com um marcador 6xHis dentro do sítio corresponde do supracitado vetor.

(017) O vetor recombinante pLEXY-sat2 pertence à plataforma de expressão de proteínas LEXSY e foi desenvolvido para ser inserido no hospedeiro eucarionte *L. tarentolae*. O vetor de expressão

em referência foi construído para ser integrado com o locus do cromossomo 18SrRNA (*ssu*) do parasito, permitindo a expressão da proteína verdadeiramente eucarionte e, específico para este trabalho, a proteína alvo foi selecionada para ser secretada no meio de cultura (BREITLING et al., 2002).

(018) A análise de similaridade do fragmento clonado revelou um produto com 843 pares de bases do locus LBRM_14_1110 da cepa *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, que é 84% similar ao gene relacionado à cinesina de *L. infantum* e codifica uma proteína de 281 aminoácidos com uma massa molecular estimada de 30.2 kDa, com 4 cópias idênticas codificando 39 aminoácidos, conforme apresentado nas SEQ ID No. 1. Os oligonucleotídeos sintéticos produzidos foram, então, inseridos no vetor recombinante pLEXSY-sat2 e clonados com marcador 6xHis.

Exemplo 3: Clonagem e propagação do plasmídeo Lbk39 numa cepa de *E. coli*

(019) Depois da construção do plasmídeo Lbk39, uma cepa quimicamente competente de *E. coli* foi escolhida para a clonagem e propagação do plasmídeo e o procedimento para cultivo foi seguido de acordo com o fabricante (Invitrogen).

(020) Posteriormente, o plasmídeo foi purificado a partir da cepa *E. coli* usando o kit de purificação Geneflow Q-Spin Plasmid DNA e foi confirmada a identidade por sequenciamento. Para confirmar a identidade do plasmídeo os primers senso P1442 (5'ccgactgcaacaaggtgtag3') e contrasenso A264 (5' catctatagagaaggtacacgtaaaag 3'), inclusos no kit LEXSY, foram utilizados.

(021) A purificação do plasmídeo Lbk39 rendeu 1.5 µg/µL de DNA e a confirmação da sua identidade por sequenciamento do produto purificado mostrou 100% de similaridade com ambos primers P1442 e A264.

(022) O alinhamento do plasmídeo Lbk39 por digestão com a enzima *SwaI* gerou um fragmento de 2.9 kbp, relacionado à parte da *E. coli*, e outro fragmento longo (aproximadamente 5kbp), relacionado ao gene Lbk39.

Exemplo 4: Transfecção do plasmídeo Lbk39 no cultivo LEXSY

(023) O plasmídeo Lbk39 propagado e purificado a partir de *E. coli* foi linearizado por digestão com a enzima *SwaI* (*Smil*), de *Streptococcus milleri* S – 10U/µL (Thermo Fischer Scientific), para preparar a transfecção do plasmídeo no hospedeiro *L. tarentolae*.

(024) A cepa LEXSY foi preparada para transfecção de acordo com o manual do kit de expressão LEXSYcon2 (for detail see <https://www.jenabioscience.com/images/ae3a4f50f1/EGE-1310.pdf>). A transfecção foi feita por eletroporação, e as células cultivadas foram manuseadas de acordo com o mesmo manual. Outra alíquota de células LEXSY foi eletroporada sem DNA sob as mesmas condições, para servir como controle negativo. As células eletroporadas foram então transferidas por um capilar para frascos de cultura de tecidos com 10 mL de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) suplementado com hemina suína, penicilina e streptomycin, a cultura foi realizada em estufa a 24 °C no escuro e sob aeração. A partir do momento em que as culturas passaram a atingir um certo ponto de turbidez (24 horas após a eletroporação), o antibiótico Nourseothricin, específico para o vetor pLEXSY-sat2, foi adicionado e o cultivo foi realizado sob as mesmas condições e repicados a cada 4 dias.

Exemplo 5: Confirmação da integração no genoma por
PCR

(025) A integração genômica do plasmídeo Lbk39 no locus cromossomal 18SrRNA (*ssu*) da cepa de *L. tarentolae* foi confirmado por reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA genômico foi extraído de 2 mL de uma cultura densa de LEXSY Lbk39 utilizando o kit Dneasy Blood & Tissue Quick-start (Qiagen). Após isso, 200 ng de DNA genômico foram adicionados em 2 microtubos de 0.2 mL (100 ng em cada), contendo a solução do mix de água RNase free ultra-pura, tampão de PCR 5xHotStar HiFidelity (incluindo dNTPs), HotStar HiFidelity DNA polimerase e os primers específicos para o diagnóstico de integração genômica: no primeiro tubo o primer senso F3001 (5'-gatctgggttgattctgccagtag-3'), responsável pela integração com todos os vetores de expressão *ssu*, e o primer contra-senso A1714 (5'-tattcggtgtcagatggcgcac-3'), responsável pela integração com todos os vetores de expressão "AP" com 5'utr *aptr*; dentro do segundo tubo, o primer senso F2999 (5'-cctagtatgaagatttcggtgatc-3'), responsável pelo diagnóstico de integração de todos os vetores de expressão *sat*, e o primer contra-senso F3002 (5'-ctgcaggttcacctacagctac-3'), responsável pelo diagnóstico de integração com todos os vetores de integração *ssu*.

(026) As condições de PCR para o par de primers F3001/A1715 foram: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos + 60°C por 30 segundos + 72°C por 1 minutos para anelamento, e 1x 72°C por 10 minutos para extensão final; as condições de PCR para o par de primers F2999/F3002 foram: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 95°C

por 30 segundos + 53°C por 30 segundos + 68°C por 4 minutos para anelamento, e 1x 72°C por 10 minutos para extensão final.

(027) Depois de 10 dias de cultura do organismo transgênico (LEXSY Lbk39), as culturas apresentaram turbidez de 10^7 células/mL, enquanto não houve crescimento celular nos frascos de controle negativo. No décimo segundo dia de cultura foi feita a confirmação da integração do Lbk39 ao genoma do parasito usando a técnica de PCR, conforme descrito acima. Dois fragmentos de DNA de diferentes tamanhos resultaram deste ensaio, um para cada par de primers: fragmento de 1.1 kbp para o primer F3001/A1715 e um fragmento de 2.3 kbp para o F2999/F3002.

Exemplo 6: Purificação da proteína recombinante Lbk39

(028) A purificação da proteína recombinante Lbk39 foi feita utilizando uma coluna de afinidade com níquel de 1 mL (HisTrap HP - GE HealthCare), colocando o meio de cultura dentro da coluna, de acordo com o manual de instruções. Após isso, sais e imidazole foram removidos por diálise em tampão PBS pH7.4 a 4°C, duas vezes por 2 horas e depois, uma vez *overnight*. Posteriormente, a concentração da proteína purificada foi feita por liofilização.

(029) Para analisar o desempenho da etapa de purificação, a proteína purificada e dialisada foi concentrada com ácido tricloroacético, carregada em um gel de eletroforese 15% SDS-poliacrilamida, e marcada com nitrato de prata.

(030) Finalmente, a determinação da concentração da proteína foi feita usando o Kit de análise de proteínas Micro BCA (Thermo Fischer Scientific).

(031) A Lbk39 foi expressa como uma proteína recombinante marcada com cauda de histidina (6xHis) em um vetor

pLEXY-sat2, inserido no locus cromossômico 18SrRNA de *L. tarentolae* e selecionado para ser secretado no meio de cultura. O procedimento de purificação e a expressão da proteína foram confirmados por eletroforese SDS-PAGE e a massa molecular mais provável da proteína alvo é de 30 kDa, como o esperado. A quantidade total de proteína recuperada foi de 40 µg/mL.

Exemplo 7: Padronização e avaliação por ELISA

(032) Para determinar os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* em soros humanos não infectados e infectados com CL, e soros humanos e caninos não infectados e infectados com VL e outras doenças que podem identificar os epítomos de Lbk39, condições ótimas de ELISA foram estabelecidas, padronizando os seguintes fatores: diluição dos soros (1:100, 1:200, 1:400 e 1:800), diluição do conjugado (1:5,000, 1:10,000 e 1:20,000) e concentrações de antígenos (0.1 µg, 0.5 µg e 0.85 µg/poço).

(033) Microplacas de poliestireno com fundo em U foram revestidas com 100 µL/poço de solução com 0,1 µL do antígeno Lbk39 (nas diferentes concentrações estudadas) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.6). As placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Além disso, proteínas solúveis do extrato bruto de cultura de *L. braziliensis* ou *L. infantum* também foram incluídas no estudo como controles positivos. No dia seguinte, as placas foram lavadas duas vezes com 200 µL/poço de solução de lavagem (NaCl – 0,9% + Tween 20 – 0,05%), e os poços foram bloqueados com 120 µL de solução bloqueadora (PBS + 0,1% caseína) por uma hora a 37°C. A seguir foram lavadas duas vezes com 200 µL/poço de solução de lavagem. Logo depois, amostras de soro foram diluídas 1:200 em uma solução de incubação (PBS + 0,25% caseína) e foram adicionadas em seus

respectivos poços e incubados a 37°C por uma hora. Então as placas foram lavadas 4 vezes com 200 µL/poço com solução de lavagem e o anticorpo policlonal IgG anti-humano ou anti-canino conjugado com HRP (2 mg/mL) foi diluído (nas diluições mencionadas acima) e adicionado em cada placa e incubados por 1 hora a 37°C. Por fim, a reação de cor foi iniciada com a adição de 100 µL de uma solução de 10.5 mL de tampão citrato + 2 mg de o-fenilenediamina dihidroclorato (2 mg/tablete) + 2 µL de H₂O₂ a 30% para cada poço em temperatura ambiente por 15 minutos, evitando luz. Para interromper a reação 20 µL de uma solução 1:20 de H₂SO₄ foram adicionados. As placas foram lidas no leitor de placas Powerwave HT (BioTek) em comprimento de onda de 492 nm e os valores expressos em absorbância. Como controle, os soros positivos e negativos foram incluídos em cada placa, quanto testando soros individuais, e cada amostra foi medida em triplicata e o ensaio completo foi feito como descrito acima.

(034) Os resultados obtidos neste ensaio mostram que não houve diferença relevante entre as amostras de pacientes portadores de VL e CL, analisadas com o antígeno recombinante Lbk39 e comparados com o antígeno padrão considerados controle positivo. Isso mostra que, ainda que a proteína-alvo seja produzida a partir de um gene relacionado à cinesina de *L. braziliensis*, os anticorpos de pacientes com leishmaniose visceral são reconhecidos pela proteína recombinante Lbk39 conforme mostram a figura 2.

REFERÊNCIAS

(035) AL-QADHI, B. N.; MUSA, I. S.; HUMMADI, Y. M. K.A. Comparative immune study on cutaneous leishmaniasis patients with single and multiple sores. **Journal of Parasitic Disease**, v.39, n.3, p.361–370, 2015.

(036) ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, n.25, p.3389-3402, 1997.

(037) BADARÓ, R., BENSON, D., EUHILIO, M.C., FREIRE, M., CUNHA, S., NETTO, E.M., PEDRAL-SAMPAIO, D., MADUREIRA, C., BURNS, J.M., HOUGHTON, R.L., DAVID, J.R., REED, S.G. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infection Disease** n.173, p.758–761, 1996.

(038) BREITLING, R.; KLINGNER, S.; CALLEWAERT, N.; PIETRUCHA, R.; GEYER, A.; EHRLICH, G.; HARTUNG, R.; MULLER, A.; CONTRERAS, R.; BEVERLEY, S. M.; ALEXANDROV, K. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **Protein Expression and Purification**, n.25, p.209–218, 2002.

(039) BURNS, J. M.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceeding of the National Academy of Science**, n.90, p.775–779, 1993.

(040) DE VRIES, H. J. C; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, n.16, p.99–109, 2015.

(041) DELGADO, O.; FELICIANGELI, M. D.; CORASPE, V.; SILVA, S.; PEREZ, A.; ARIAS, J. Value of a dipstick based on recombinant rK39 antigen for differential diagnosis of American Visceral Leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. **Parasite**, n.8, p.355-357, 2001.

(042) FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J. A.; VASTA, G. R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v.26, n.5, p. 244-54, 2010.

(043) KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n.2, p. 159-162, 2012.

(044) KLATT, S.; KONTHUR, Z. Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae*. **Microbial Cell Factories**, n.11, p.97, 2012.

(045) KUSHNIR, S.; CIRSTEAN, I. C.; BASILIYA, L.; LUPILOVA, N.; BREITLING, R.; ALEXANDROV, K. Artificial linear episome-based protein expression system for protozoon *Leishmania tarentolae*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, n. 176, p.69–79, 2011.

(046) MARTINS, V. T.; LAGE, D. P.; DUARTE, M. C.; COSTA, L. E.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; ROATT, B. M.; MENEZES-SOUZA, D.; TAVARES, C. A. P.; COELHO, E. A. F. Cross-protective efficacy from a immunogen firstly identified in *Leishmania infantum* against tegumentary leishmaniasis. **Parasite Immunology**, n. 38, p.108–117, 2016.

(047) MOLINET, F. J. L.; AMPUERO, J. S.; COSTA, R. D.; NORONHA, E. F.; ROMERO, G. A. S. Specificity of the rapid rK39 antigen-based immunochromatographic test Kalazar Detect® in patients with cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, n. 3, p.293-296, 2013.

(048) PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J. C.; QUAIL, M. A.; PETERS, N.; ADLEM, L.; TIVEY, A.; ASLETT, M.;

KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M. A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON¹, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S. L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D. P.; OYOLA, S. O.; DHILLEY, J.; BRITO, L. O.; TOSI, L. R. O.; BARRELL, B.; CRUZ, A.; MOTTRAM, J. C.; SMITH, D. F.; BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v.39, n.7, p.839–847, 2007.

(049) VAISH, M.; SINGH, O. P.; CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. rK39 Antigen for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis by Using Human Saliva. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86, n.4, p. 598–600, 2012.

Reivindicações

1. Sequência sintética de nucleotídeos (SEQ ID NO: 1) a ser inserida no vetor de expressão em sistema Lexsy, caracterizada por codificar proteína recombinante Lbk39.
2. Proteína recombinante Lbk39 de *Leishmania braziliensis*, produzida de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por consistir na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 2.
3. Antígeno recombinante, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser para uso em métodos in vitro para detecção de imunocomplexos contra *Leishmania* que compreendem as seguintes etapas:
 - a. ligação de anticorpos anti-*Leishmania* de uma amostra biológica de paciente à proteína recombinante consistindo da sequência SEQ ID NO: 2, estar ligada a um suporte sólido ou a um carreador;
 - b. contactar os anticorpos do passo (a) com um anticorpo secundário ou uma proteína, conjugados a uma enzima ou a um marcador e que se ligam aos anticorpos do passo (a);
 - c. detectar os anticorpos anti-*Leishmania* na amostra de pacientes pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligada ao dito anticorpo anti-*Leishmania*.
4. Método in vitro de detecção de *Leishmania*, de acordo com as reivindicações 2 e 3, caracterizado pelo fato de que amostra biológica compreender qualquer fluido corporal contendo anticorpos, incluindo, como sangue, soro, plasma, lágrima, urina e saliva.
5. Método in vitro para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com as reivindicações 3 e 4, caracterizado por utilizar antígeno de sequência SEQ ID NO: 2 e pelo fato de:
 - a) as amostras serem selecionadas do grupo incluindo sangue, soro,

plasma, saliva, secreção lacrimal ou outro fluido corporal;

b) o carreador ser uma partícula de ouro;

c) a enzima ser selecionada do grupo consistindo de fosfatase alcalina, peroxidase, β -galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase;

d) o marcador ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, estreptavidina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes;

e) a proteína recombinante SEQ ID NO: 2 poder ser usada como antígeno.

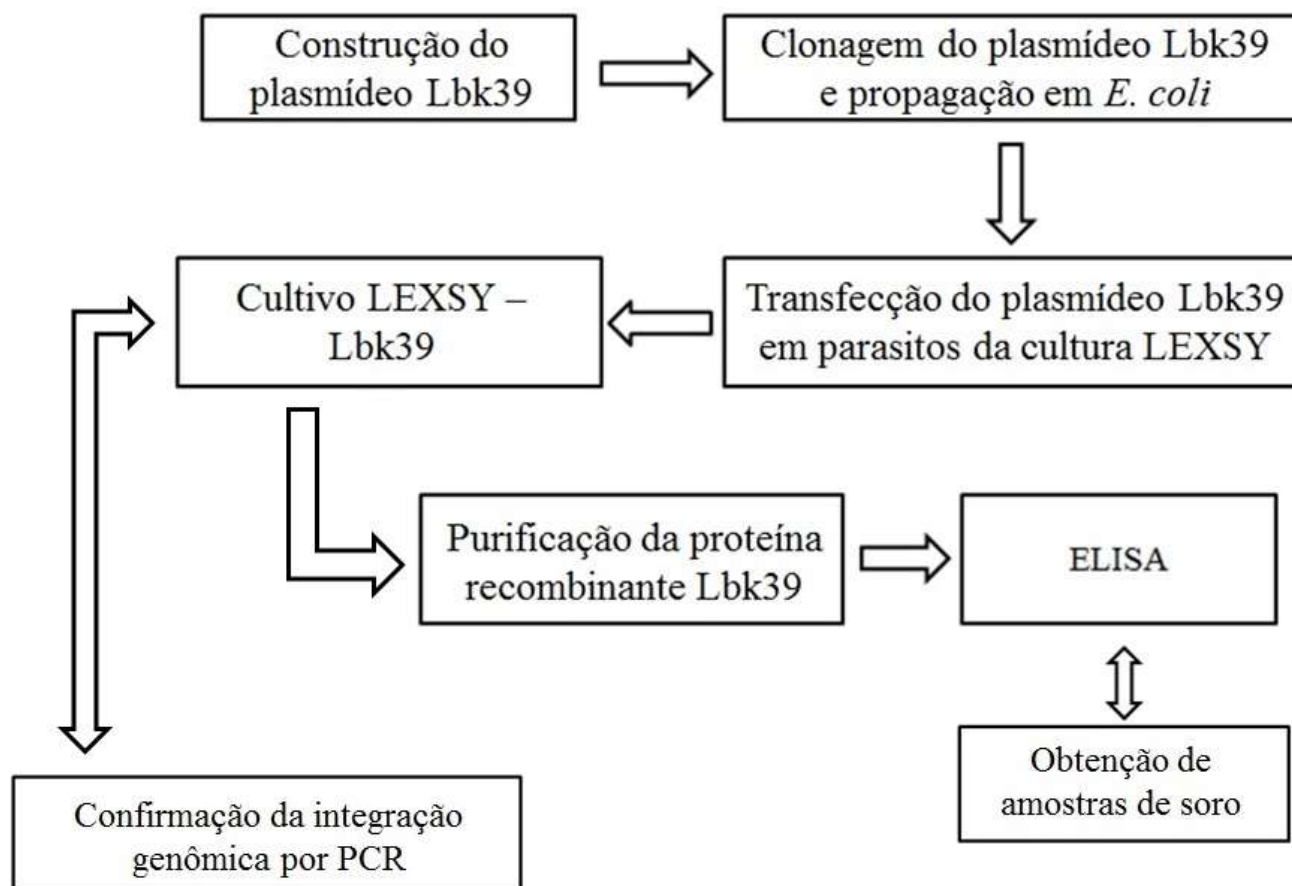
Figuras**Figura 1**

Figura 2

