



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 102022019650-8

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 102022019650-8

(22) Data do Depósito: 29/09/2022

(43) Data da Publicação Nacional: 05/12/2023

(51) Classificação Internacional: C07K 14/00; G01N 33/543; G01N 33/569.

(54) Título: PEPTÍDEO SINTÉTICO PARA DIAGNÓSTICO DE COVID19 EM PLATAFORMA DE IMUNO-ELETROQUÍMICA E SEU USO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA XV DE NOVEMBRO, 1299 - CENTRO, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80060-000, Brasileira; IMUNOVA BIOLOGICAS 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; LUIZ HUMBERTO MARCOLINO-JUNIOR; BEATRIZ ARNOLD BRAZ; MANUEL HOSPINAL SANTIANI; VANETE THOMAZ SOCCOL; MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI; BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO.

Código de Controle: 905F647854EB65AE AF9673410A483685

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 29/09/2022, observadas as condições legais

Expedida em: 10/09/2024

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

PATENTES
ICTs

PEPTÍDEO SINTÉTICO PARA DIAGNÓSTICO DE COVID19 EM PLATAFORMA DE IMUNO-ELETROQUÍMICA E SEU USO

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção reivindica peptídeo artificial modificado a partir do peptídeo P.SC2.S.203 (SEQ NO 1) em BR 10 2020 024403-5 (Thomaz Soccol V.; Manuel HospinalSantiani; 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; 30/11/20; ANTÍGENOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA O DIAGNÓSTICO DO SARS-COV-2; BR1020200244035). A nova sequência modificada será usada como antígeno em método imuno-eletroquímico para detectar uma quantidade ou concentração de anticorpos contra SARS-CoV-2 em amostras biológicas de portadores de SARS-CoV-2.

[002]. Na sequência original foi realizada uma modificação do peptídeo pela adição de sequência de acoplamento (EPLQLKM) em C terminal para ligação com ouro coloidal. Outra inovação desta invenção é a inclusão do peptídeo em eletrodos com suporte de grafeno, que é para a detecção de pelo menos um tipo de anticorpo anti-SARS-CoV-2, (anti-IgT, IgA, IgG e/ou IgM), podendo ser usado para mais amostras biológicas de pacientes.

Fundamentos da Invenção e Descrição do Estado da Técnica

[003]. O Coronavírus, causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), é um novo betacoronavírus (β -coronavírus) que surgiu em Wuham, China, em dezembro de 2019 causador da COVID-19. Até recentemente foi responsável por 6,3 milhões de morte em todo mundo e 546 milhões de casos de infecção confirmados em laboratórios entre os anos de 2019-22. A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que a COVID-19 era uma Emergência de Saúde

Pública, de Preocupação Internacional em 30 de janeiro de 2020 e reconheceu-a como uma pandemia em 11 de março de 2020.

[004]. O vírus SARS-CoV-2 é membro da família Coronaviridae, um viroide entre 50 e 200 nm de diâmetro, e com um genoma de RNA monocatenário de sentido positivo. O RNA viral da SARS-CoV-2 codifica quatro proteínas estruturais: pequeno envelope (E); matriz (M), nucleocapsídeo (N) espiga de glicoproteína (S); sete proteínas acessórias (Orf3a, Orf6, Orf7a, Orf7b, Orf8, Orf9, Orf10) e uma poliproteína de estrutura de leitura aberta 1a e 1b, codificada em Orf1ab, que pode ser proteolicamente clivada em 16 proteínas não-estruturais putativas (Nsp), que podem estar envolvidas na replicação viral do RNA, transcrição e papel de suporte (CHAN, J. F.-W. 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). As proteínas E e M são importantes na montagem viral em coronavírus. A proteína N forma complexos com RNA genômico e é importante para aumentar a eficiência da transcrição e montagem viral (WANG, H. 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).

[005]. A via de transmissão do SARS-CoV-2 ocorre, principalmente pela inalação de gotículas respiratórias muito finas, partículas de aerossol, deposição de gotículas respiratórias e partículas nas membranas mucosas expostas como na boca, nariz ou olho; por salpicos e pulverizações diretas, ou tocar as membranas mucosas com as mãos que estejam sujas com fluidos respiratórios contendo vírus, ou indiretamente tocando superfícies com vírus sobre elas.

[006]. Os sintomas da doença podem aparecer de dois a catorze dias após a exposição. Os doentes apresentam sintomas tais como febre, mal-estar, tosse, e/ou falta de ar. A maioria dos adultos ou crianças com infecção por SARS-CoV-2 apresentam ligeiros sintomas

semelhantes aos da gripe, contudo, os doentes críticos desenvolvem rapidamente a síndrome de angústia respiratória aguda, insuficiência respiratória, falência de múltiplos órgãos e mesmo morte.

[007]. Para diagnóstico há necessidade de métodos e kits para avaliar a transmissão do coronavírus em humanos, em combinação com métodos para avaliar anticorpos contra-SARS-CoV-2 (como as imunoglobulinas IgG, IgM e IgT) em uma ou mais amostras biológicas obtidas de um indivíduo.

[008]. Biossensores são dispositivos analíticos utilizados para detectar a interação entre um material biológico (enzimas, proteínas, anticorpos, entre outros) e um analito de interesse. Essa interação é detectada por um transdutor que converte a informação da interação em um sinal mensurável. Os biossensores têm sido aplicados como excelente ferramenta para detecção analítica em diferentes aplicações como biomédica, ambiental, alimentos, diagnóstico de doenças infecciosas, entre outras (EISSA, S. Diagnostic biosensors for coronaviruses and recent developments. *Advanced Biosensors for Virus Detection*, n. M, p. 261–278, 2022).

[009]. Os imunossensores são biossensores utilizados para detectar a ligação entre anticorpos e antígenos, ou antígenos e anticorpos ancorados na superfície dos transdutores, os quais definem sua classificação como eletroquímica, óptica ou piezoelétrica (FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 102, n. October, p. 470–478, 2018). Imunossensores eletroquímicos são dispositivos concebidos para detectar reações imunoquímicas que ocorrem entre um antígeno e o anticorpo imobilizado na superfície do eletrodo (podendo ser de diferentes materiais como grafeno, ouro, prata, platina, e outros materiais). Imunossensor é constituído de uma camada de um nanomaterial funcional (ouro, grafeno, entre outros) e uma segunda camada de biomoléculas (por exemplo, anticorpos, proteínas

recombinantes, peptídeos) que estão quimicamente ligadas com o nanomaterial.

[010]. Os imunossensores eletroquímicos são utilizados no diagnóstico de diferentes tipos de vírus como hepatite B e C (BIASOTTO, G.; COSTA, J. P. C.; COSTA, P. I.; ZAGHETE, M. A. ZnO nanorods-gold nanoparticle-based biosensor for detecting hepatitis C. *Applied Physics A*, v. 125, n. 12, p. 821, 2019; BONG, J. H.; KIM, H. R.; JUNG, J.; et al. Switching-peptides for one-step immunoassay and its application to the diagnosis of human hepatitis B. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 178, n. October 2020, p. 112996, 2021), influenza (JOSHI, S. R.; SHARMA, A.; KIM, G.-H.; JANG, J. Low cost synthesis of reduced graphene oxide using biopolymer for influenza virus sensor. *Materials Science and Engineering: C*, v. 108, p. 110465, 2020), dengue (NAWAZ, M. H.; HAYAT, A.; CATANANTE, G.; LATIF, U.; MARTY, J. L. Development of a portable and disposable NS1 based electrochemical immunosensor for early diagnosis of dengue virus. *Analytica Chimica Acta*, v. 1026, p. 1–7, 2018), Zika (CABRAL-MIRANDA, G.; CARDOSO, A. R.; FERREIRA, L. C. S.; SALES, M. G. F.; BACHMANN, M. F. Biosensor-based selective detection of Zika virus specific antibodies in infected individuals. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 113, p. 101–107, 2018), HIV (CERRUTTI, B. M.; MORAES, M. L.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V. Lignin as immobilization matrix for HIV p17 peptide used in immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 71, p. 420–426, 2015; GOGOLA, J. L.; MARTINS, G.; GEVAERD, A.; et al. Label-free apta-sensor for p24-HIV protein detection based on graphene quantum dots as an electrochemical signal amplifier. *Analytica Chimica Acta*, v. 1166, p. 1–7, 2021), coronavírus (ALI, M. A.; HU, C.; JAHAN, S.; et al. Sensing of COVID-19 antibodies in seconds via aerosol jet nanoprinted reduced-graphene-oxide-coated 3D electrodes. *Advanced Materials*, v. 33, n. 7, p. 2006647, 2021; SOTO, D.; OROZCO, J. Peptide-based simple detection of SARS-CoV-2 with electrochemical readout. *Analytica Chimica Acta*, v. 1205, p. 339739, 2022), entre outros.

[011]. Os imunossensores possuem algumas vantagens em relação aos métodos analíticos tradicionais devido ao baixo custo, portabilidade, miniaturização, facilidade de uso, monitorização no local, boa seletividade e sensibilidade. No entanto, o desempenho analítico dos imunossensores ainda necessita de melhorias, e com este objetivo, nanomateriais como grafeno, nanopartículas de ouro, nanotubos de carbono, têm sido utilizados nas plataformas dos imunossensores. Além disso, novos sítios de reconhecimento que se ligam especificamente a diferentes tipos de vírus, como aptâmeros e peptídeos específicos também estão sendo aplicados nestes dispositivos (BRAZACA, L. C.; DOS SANTOS, P. L.; DE OLIVEIRA, P. R.; et al. Biosensing strategies for the electrochemical detection of viruses and viral diseases – A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1159, 2021; EISSA, S. Diagnostic biosensors for coronaviruses and recent developments. *Advanced Biosensors for Virus Detection*, n. M, p. 261–278, 2022).

[012]. Os peptídeos possuem excelentes propriedades de reconhecimento com alto potencial para uma variedade de aplicações diagnósticas e terapêuticas. Em relação aos testes de diagnóstico o uso dos peptídeos aumenta a especificidade e a sensibilidade do teste em relação ao uso da sequência completa de uma proteína, além de isso modificando a sequência do peptídeo, ele ajuda a melhorar a capacidade de conjugação ou imobilização com o eletrodo, para poder desenvolver imunossensores.

[013]. Entre as nanoestruturas, o óxido de grafeno reduzido (rGO) tem se destacado na aplicação de imunossensores eletroquímicos, uma vez que apresenta excelentes propriedades condutoras, grande área superficial e facilidade de modificação de superfície (SINGH, R.; HONG, S.; JANG, J. Label-free Detection of Influenza Viruses using a Reduced Graphene Oxide-based Electrochemical Immunosensor Integrated with a Microfluidic Platform. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 42771, 2017).

[014]. Alguns testes de diagnóstico de SARS-CoV-2 usam a proteína Spike completa ou a proteína da nucleocapsídeo. Exemplo

de uso destas proteínas são as patentes WO2021211332 (Muerhoff, A. Scott; Prostko, John C.; Rodgers, Mary A.; Cloherty, Gavin A.; Stewart, James L.; Hartnett, James; Moore, Jeff; Otis, Kathy; Kar, Alak; Tu, Bailin; Tieman, Bryan; Strobel, Carolyn; Hawksworth, David; Ziemann, Robert; Lin, Zhihong; Marohnic, Chris; Wiebe, Peter; Meyer, Todd; 21/10/2021; METHODS AND KITS FOR DETECTING OR DETERMINING AN AMOUNT OF AN ANTI-B-CORONAVIRUS ANTIBODY IN A SAMPLE; WO2021211332); e WO2021211331 (Antti Virtanen, Jake; Bezaire; Scott Muerhoff; 13/04/2020; PROCÉDÉS, COMPLEXES ET KITS POUR DÉTECTER OU DÉTERMINER UNE QUANTITÉ D'UN ANTICORPS ANTI-SS-CORONAVIRUS DANS UN ÉCHANTILLON; WO2021211331) em plataforma de fluxo lateral. Em outros testes desenvolvidos que usam a plataforma de imunoeletroquímica para a detecção dos anticorpos com as proteínas S ou N do vírus SARS-CoV-2 tem as patentes US20220065807 (Gao; Wei; Torrente-Rodriguez; Rebeca M.; Lukas; Heather; 02/09/2021; MULTIPLEXED SENSOR FOR ULTRA-FAST AND LOW-COST COVID-19 DIAGNOSIS AND MONITORING) e, US20220074882 (Suzanne; Becker; Michael; 03/09/2021; ELECTROCHEMICAL-BASED SENSOR FOR RAPID AND DIRECT DETECTION OF SARS-COV-2; WITT; US20220074882). Ou ainda são usadas nas patentes: 1) WO2022101797 (Sõritski, Vitali; Reut, Jekaterina; Boroznjak, Roman; Kidakova, Anna; Öpik, Andres; Raziq, Abdul; Ratnik, Kaspar; Naaber, Paul; 10/11/2021; METHOD OF MAKING A PORTABLE MIP-BASED ELECTROCHEMICAL SENSOR FOR THE DETECTION OF THE SARS-COV-2 ANTIGEN; WO2022101797) que pesquisa anticorpos; 2) na patente WO2022157344 (Akbar, Sarah; Peacock, Martin James; 25/01/2021; ELECTRODE AND SENSOR DEVICE FOR SARS-COV-2 DETECTION AND CORRESPONDING IN-VITRO DETECTION METHOD; WO2022157344) utilizam a proteína A, proteína G ou proteína L para a ligação do sensor com os anticorpos anti-proteína N do vírus; 3) na patente WO2022077027 (De la Fuente-Nunez, Cesar; Der Torossian Torres, Marcelo; Reis de Araujo, William; 03.03.2021; LOW-COST RAPID DIAGNOSTIC FOR COVID-19 AND OTHER PATHOGENS; WO2022077027) é utilizada a proteína ACE2, 4) já na

patente CN114047243 (Zhang Liyun; Han Cong; Li Qian; Xing Wenping; FangXiaona; LuoZhaofeng; 16.11.2021; Electrochemical aptamer sensor for detecting SARS-CoV-2 based on CRISPR/Cas12a; CN114047243) utilizam um aptâmero e CRISPR/CAS12A. Apesar dos exemplos de patentes mostradas acima nosso invento é um método de diagnóstico point of care usando um peptídeo acoplado a um sensor eletroquímico para o diagnóstico de COVID-19 em amostras biológicas (soro, saliva e sangue). O peptídeo é ligado a uma matriz de grafeno vinculado a um sensor eletroquímico, com as vantagens de ser um kit com aumento da sensibilidade e especificidade do teste; permite a quantificação dos anticorpos anti-SARS-CoV-2; permite a utilização sem a necessidade de instalações especializadas; e por ser de baixo custo. Com esse melhoramento, haverá aumento do âmbito da sua utilização fora de laboratórios ou clínicas.

Descrição da abordagem do problema técnico

[015]. A pandemia de coronavírus (SARS-CoV-2) exponenciou as preocupações com os surtos virais e, conseqüentemente, trouxe enormes desafios à segurança pública. Em relação aos vários tipos de testes diagnósticos, o mais disponível atualmente é o molecular, que detecta o genoma viral. Este teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) visa identificar a presença do RNA do vírus em amostras de swab nasal ou de garganta, mas não quantifica a carga viral. Apesar da alta precisão dos testes de PCR, a obtenção dos resultados demanda longos períodos, são necessários profissionais e equipamentos especializados, o que exige centros de pesquisa para a realização dos testes (BRAZACA, L. C.; DOS SANTOS, P. L.; DE OLIVEIRA, P. R.; et al. Biosensing strategies for the electrochemical detection of viruses and viral diseases – A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1159, 2021).

[016]. Outro tipo de teste avalia a resposta imune contra o agente patogênico através da reação antígeno-anticorpos. Esses anticorpos

são essenciais na recorrência do vírus na comunidade e seu monitoramento é necessário para estabelecer a extensão e duração da imunidade ao SARS-CoV-2. O status do anticorpo permitirá identificar a capacidade de contrair ou resistir à infecção de uma população.

[017]. A presença de anticorpos pode ser detectada com base em um antígeno recombinante sintético, como peptídeos, projetados para imitar estruturas específicas do vírus, de modo que quaisquer anticorpos presentes nas amostras com afinidade de ligação reagem com o antígeno (FELIX, F. S.; ANGNES, L. *Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications*. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 102, n. October 2017, p. 470–478, 2018; JACOFISKY, D.; JACOFISKY, E. M.; JACOFISKY, M. *Understanding antibody testing for COVID-19*. *The Journal of Arthroplasty*, v. 35, n. 7, p. S74–S81, 2020; e VEDOVA-COSTA, J. M. DELA; RAMOS, E. L. P.; BOSCHERO, R. A.; et al. *A review on COVID-19 diagnosis tests approved for use in Brazil and the impact on pandemic control*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 64, p. 1–14, 2021).

[018]. As plataformas eletroquímicas prometem superar algumas desvantagens das plataformas convencionais de diagnóstico, como acessibilidade e portabilidade, sendo uma excelente proposta para detecção rápida no ponto de atendimento de SARS-CoV-2 e outros vírus, visando não apenas o RNA viral, mas também antígenos e anticorpos. Portanto, a presente invenção aborda o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico baseado em peptídeo de ligação sólida com afinidade ao grafeno, testado com rGO, e ao ouro coloidal (AuNPs). Os peptídeos foram sintetizados com uma sequência específica para detectar anticorpos – IgG de SARS-CoV-2 (Anti-S) e apresenta estabilidade e facilidade de manuseio.

[019]. Na presente invenção é proposto usar peptídeo sintético modificados isoladamente e diferentes combinações com a matriz de um imunossensor para a detecção dos anticorpos IgG, IgM, IgA e IgT

contra COVID-19 em amostras biológicas de pacientes com maior sensibilidade e especificidade que os métodos sorológicos tradicionais.

[020]. A tecnologia proposta trata de um teste point of care conveniente e extremamente rápido para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA em humanos infectados com o vírus SARS-COV-2 ou outros animais utilizando uma amostra de fluido biológico. Este teste poderá ajudar a enfrentar o desafio global de fornecer diagnóstico rápido de pessoas doentes para impedir a propagação de vírus, tais como o SARS-CoV-2 e as suas variantes, e especificidade e afinidade suficientes para ligar ao revestimento de funcionalização do sensor.

Descrição detalhada da Invenção

[021]. O teste point of care aqui reivindicado pode analisar uma amostra biológica líquida de um sujeito humano ou outro animal e fornecer uma indicação imediata da presença de anticorpos acima de uma concentração limite normal. O imunossensor point of care utiliza nanotecnologia e componentes robustos, produzindo testes e kits de detecção sorológica, que não são invasivos, rápidos e precisos. Os resultados podem ser obtidos em 3 a 70 minutos para a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 usando, por exemplo, amostra de soro. A rapidez do teste torna-o uma opção ideal para rastrear indivíduos infectados (incluindo indivíduos assintomáticos), em hospitais, clínicas e centros de saúde, locais de trabalho, aeroportos, portos de entrada, escolas, em locais de rastreio comunitários, em casa, e para pessoas em viagem, mesmo durante a viagem.

[022]. Para desenvolver o teste point of care, o peptídeo de sequência KKGPSKPSKRSFIEDLLF foi modificado com a adição de alguns aminoácidos: Na sequência de aminoácidos definida no SEQ ID NO: 1, tem uma substituição na posição 1 a 3 pela sequência WAGAKRLVLRRE.

[023]. Os aspectos chave do dispositivo biossensor eletroquímico (imunossensores) são o uso de peptídeo (SEQ N°1) usados como revestimento de funcionalização aplicado ao eletrodo de trabalho do

dispositivo. Os esquemas gerais do revestimento de funcionalização e estrutura do eletrodo são mostrados nas FIGs 1A-1B. Como mostrado no FIG. 1A, o substrato (1), que é eletricamente isolante, é revestido na área de colocação da amostra com uma camada de elementos sensores (2), tais como nanotubos de carbono, flocos de grafeno. Os elementos sensores, por sua vez, são revestidos com uma ou mais camadas de peptídeos e moléculas bloqueadoras (3). A camada de nanotubos é então revestida com uma ou mais camadas de receptor da amostra (4), que é exposta ao fluido de amostra biológica depositada na área de colocação da amostra.

[024]. Em um exemplo da funcionalização do eletrodo do dispositivo, na FIG. 2 é retratado um processo de fabricação do sensor para SARS-CoV-2 e testes baseados no uso do peptídeo (SEQ N°1), no qual o anticorpo anti-SARS-CoV-2 se ligará. Um substrato é representado no item 1 da FIG. 2. O substrato pode ser uma camada isolante. Por exemplo, o substrato pode incluir plásticos, vidro, polímeros, silício, poliimida, poliéster, polidimetilsiloxano (PDMS), papel, tereftalato de polietileno, naftalato de polietileno, algodão, polimetacrilato de metila, ainda pode ser uma combinação deles. No item 2 é adicionado um substrato condutor que podem incluir grafite, carbono, platina, prata/cloreto de prata, alumínio, grafeno, chumbo, aço carbono, níquel, cromo, cobre, prata, tântalo, antimônio, estanho, tungstênio, irídio, bismuto, titânio, molibdênio, e uma combinação deles. Os nanotubos de grafeno e carbono (de qualquer espessura) podem ser associados à nanopartículas e um e em mais reticulados. O grafeno e nanotubos de carbono podem ser utilizados para a condução. Neste sensor é incluída uma camada onde será composta dos seguintes elementos: peptídeos representados por 3. Elementos de ligação com a camada condutora representados por 4 que pode incluir nanocolóides de óxido de grafite (rGO). Um elemento de bloqueio de ligação não específico representados por 5 que podem incluir soro bovino fetal (BSA), caseína, albumina bovina fetal (SBF), gelatina, leite em pó sem

gordura, polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), e polivinilpirrolidona (PVP), e uma combinação deles.

[025]. Em alguns aspectos, nesta invenção pelo menos um tipo de ligação específico ocorrerá quando o imunossensor for exposto a uma amostra biológica (soro, sangue, saliva e plasma). Esta ligação compreende pelo menos uma região do peptídeo (SEQ N° 1), onde o método é realizado de forma que essa ligação específica se vincula a (a) um anticorpo IgG anti-coronavírus; (b) um anticorpo IgM anti-coronavírus; (b) ambos um anticorpo IgG anti-coronavírus e um anticorpo IgM anti-coronavírus.

EXEMPLO 1: Construção do imunossensores

[026]. Em relação à construção do imunossensor, foi realizado com duas metodologias drop casting e eletrodeposição.

[027]. Para a metodologia de eletrodeposição, o primeiro passo foi imobilizar grafeno (Graphene quantum dot - GQD) mediante a voltametria cíclica (número de ciclos 2-10), para o qual foi depositado 5 até 50 μL de GQD sobre área do eletrodo de trabalho com variação de voltagem de 0,0 V a -1,5 V. No próximo passo foi feita a adição 5 a 50 μL EDC e NHS (1-10 mMol L^{-1} e 10-100 mMol L^{-1} , respectivamente) e incubado por 5 a 170 min em temperatura ambiente. Por último foi realizada a imobilização dos peptídeos por deposição de 2 - 60 μL de solução aquosa (0,01-1,00 mg mL^{-1}).

[028]. Na terceira etapa, se avalia a montagem do imunossensor, constituído pela deposição dos diferentes elementos sobre a superfície do eletrodo, os quais foram analisadas por voltametria cíclica, utilizando solução de Ferri/Ferrocianeto de potássio (0,5 – 60 mMol L^{-1}) em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4. Para isso foi realizada uma varredura de voltagem entre 0,8 V a -0,5 V. As etapas de construção do eletrodo foram confirmadas pelas variações das intensidades de corrente dos picos catódicos e anódicos entre os voltamogramas (FIG. 3).

EXEMPLO 2. Avaliação do imunossensor usando o Pep 1 (SEQ N°1) como antígeno

[029]. Para melhorar a capacidade do peptídeo em se fixar ao eletrodo, para o qual um segmento aminoacídico foi adicionado ao peptídeo (adaptador) gerando o Pep. 1 (SEQ N°1). O imunossensor foi construído de acordo com o exemplo 1.

[030]. Para a avaliação do imunossensor, a região do eletrodo de trabalho dos imunossensores da plataforma foi recoberta com 2-60 μL dos soros diluídos e incubados por 5 a 160 minutos a 4 - 24 $^{\circ}\text{C}$ em atmosfera saturada de vapor para evitar evaporação. Os imunossensores foram avaliados por voltametria cíclica (-0,6 V a 0,8 V, 50 mV s^{-1} , 2 - 5 ciclos) e voltametria de pulso diferencial (-0,6 V a 0,8 V, 5 mVs^{-1}), ambos com uma sonda de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. imunossensor. Os resultados obtidos para essas medidas iniciais estão apresentados na FIG. 4, a adição por *drop casting* de Pep. 1 (SEQ N°1) e rGO foi indicada pela diminuição do sinal anódico da sonda (I_{pa}) de 15,82 μA para 12,67 μA (Figura 4b), em relação ao sensor (SPE), posteriormente BSA ou caseína (Bloqueio) foi adicionado e incubado a 4 $^{\circ}\text{C}$ com atmosfera de água saturada e lavado por imersão em PBS, foi avaliado pela diminuição do sinal redox da sonda e verificado o aumento de R_{ct} do imunossensores de 2,71 $\text{k}\Omega$ para SPE a 9,50 $\text{k}\Omega$ após completar o procedimento de construção do imunossensores (FIG. 5). Por fim, AbS foi detectado contra Pep. 1 (SEQ N°1), induzindo a formação de imunocomplexos, que foi avaliado pela diminuição do pico da corrente anódica da sonda após o tempo de incubação ($\Delta I = 0,83 \mu\text{A}$).

[031]. Foi realizado testes de sensibilidade analítica. Para o qual foi realizada a curva analítica em PBS 0,1 mol L^{-1} com diferentes concentrações do anticorpo SARS-CoV-2 (AbS), variando de 5,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o imunossensor com o antígeno Pep. 1 (SEQ N°1) acoplado arGO. Os resultados obtidos mostram aumento da variação

da intensidade de corrente obtida entre o sinal voltamétrico após a incubação com o bloqueio e com o teste contra AbS (ΔI), de acordo com o aumento da concentração de AbS. A curva analítica apresentou resultados eletro-analíticos promissores, com regressão linear de $r^2 = 0,913$ e limite de detecção de $0,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ como resposta do ensaio contra o anticorpo (FIG. 5).

[032]. Foi realizado testes de especificidade analítica, com anticorpos específicos para outras proteínas, para os quais foram utilizados anticorpo SARS-CoV-2 Anti-N (AbN) ($1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$) e anticorpos YFV (AbYFV) ($1,60 \mu\text{g mL}^{-1}$) e uma mistura de AbS específico com os anticorpos inespecíficos citados acima (AbMix). Com os resultados obtidos (FIG. 6), foi verificada a seletividade do imunossensor.

[033]. Partindo dos resultados anteriores (sensibilidade e especificidade analíticas) foi avaliado os imunossensores com amostras de soros humanos positivos e de indivíduos negativos (soros coletados antes da pandemia Covid-19) em diferentes diluições. Com base nos resultados das amostras testadas e no valor de cut-off obtido (95%) foi possível distinguir as respostas de soros positivos e negativos. Portanto, as amostras com resposta acima de 95% podem ser consideradas negativas, pois o intervalo de confiança calculado foi de $102 \pm 7,4\%$, e abaixo desse valor são considerados resultados positivos com intervalo de confiança de $78 \pm 6,3\%$ (FIG. 7).

Descrição das Figuras

[034]. As figuras listadas abaixo representam exemplos de resultados obtidos nesta invenção:

[035]. Figura 1 – A FIGURA 1 (representada nos itens A e B) representa um esquema de construção dos imunossensores com os diferentes elementos a serem usados nas etapas do processo de construção (1) Suporte do sensor; (2) Elementos sensores; (3) camada de revestimento para especificidade do imunossensores; (4), área de inserção da amostra.

[036]. Figura 2 - Demonstra o esquema de construção do imunossensor. (1) Suporte do sensor, (2) Elementos sensores, (3) Antígeno Peptídeo SEQ. No.1, (4) Elementos de ligação peptídeo com sensor, (5) moléculas de bloqueio.

[037]. Figura 3 – Na FIG. 3, são representados os voltamogramas de desenvolvimento do imunossensores.

[038]. Na FIG: 4. O item a) representa os CVs obtidos para cada etapa da construção do imunossensor com o Pep. 1 (SEQ. N°1), com 0,1 - 10,0 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆] em PBS 0,1 a 1,0 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹. b) Dados resumidos obtidos do pico de corrente anódica (I_{pa}) da sonda para cada etapa de construção do sensor (n=3, ±SD).

[039]. Na FIG: 5. É dada a curva analítica obtida para o imunossensor com Pep. 1 (SEQ. N°1) através da intensidade do pico de corrente da sonda vs concentração de AbS (n = 3, ±SD), em PBS 0,1-1,0 mol L⁻¹, pH 7,4 e utilizando como sonda 0,1 a 10,0 mmol L⁻¹ de (K₃[Fe(CN)₆]).

[040]. Na FIG: 6. São dados de DPV resumidos para teste de seletividade dos imunossensores com Pep. 1 (SEQ. N°1) contra anticorpos de YFV, AbN SARS-CoV-2 e uma mistura com AbS, YFV e AbN (n = 3, ± SD).

[041]. Na FIG: 7. Estão os dados resumidos de DPV para ensaios com soro humano negativo e positivo (n = 3, ± SD) para COVID-19.

Reivindicações

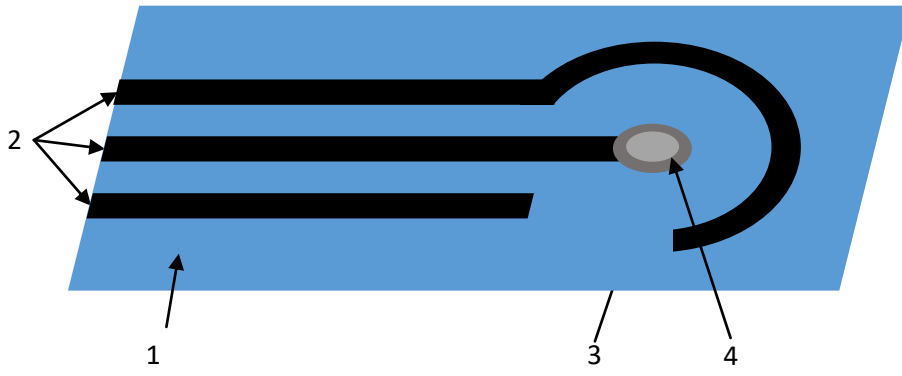
1. PEPTÍDEO artificial de SARS-CoV-2 caracterizado por consistir a sequência que consiste em SEQ. ID. NO.1.
2. PEPTÍDEO artificial de SARS-CoV-2, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por constituir o antígeno a ser usado em eletrodos para teste imunoeletrouímico para diagnóstico de COVID-19.
3. PEPTÍDEO artificial, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser antígeno específico de captura de anticorpos (Ig totais, IgA, IgM e IgG) ANTI SARS-Cov-2, usado na construção do imunossensor.
4. IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA de anticorpos contra SARS-Cov-2 caracterizado por compreender:
 - (a) eletrodo podendo ser de grafite com nanotubos de carbono ou nanopartículas de ouro;
 - (b) materiais nanotecnológicos como plásticos, vidro, polímeros, silício, poliamida, poliéster, polidimetilsiloxano (PDMS), papel, tereftalato de polietileno, naftalato de polietileno, algodão, polimetacrilato de metila, individualmente ou em combinação;
 - (c) antígeno imobilizado (Peptídeo SEQ. ID. NO. 1) no imunossensor e;
 - (d) sonda de $K_3[Fe(CN)_6]$.
5. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE IMUNOSSENSOR, conforme definido na reivindicação 4, caracterizado por dispersão de óxido de grafeno reduzido (rGO) em água utilizando 100 mL (0,030 a 0,1 mg mL⁻¹), sob aquecimento (85-100 °C) em banho de óleo; dispersão de um volume de 10-100 µL de uma solução previamente preparada de dicloridrato de hidrazina (N₂H₄-2HCl) de 1 a 4 mol L⁻¹ e 10 a 100 µL de uma solução aquosa de hidróxido de amônio (NH₄OH) de 10 a 40%; agitação a 85 a 100 °C durante 0,5 a 2 h; sonicação em banho de ultrassons de 5 a 40 min para dispersar os sólidos formados na interface ar-líquido durante o processo de redução.
6. KIT PARA TESTE IMUNOELETROQUÍMICO para diagnóstico de COVID-19, caracterizado por conter o peptídeo (SEQ. ID. NO. 1) na concentração de 80

ng/mL a 5,2 mg/mL, ligado a um suporte sólido como rGO; e controles positivos e controles negativos.

FIGURAS

FIG.1

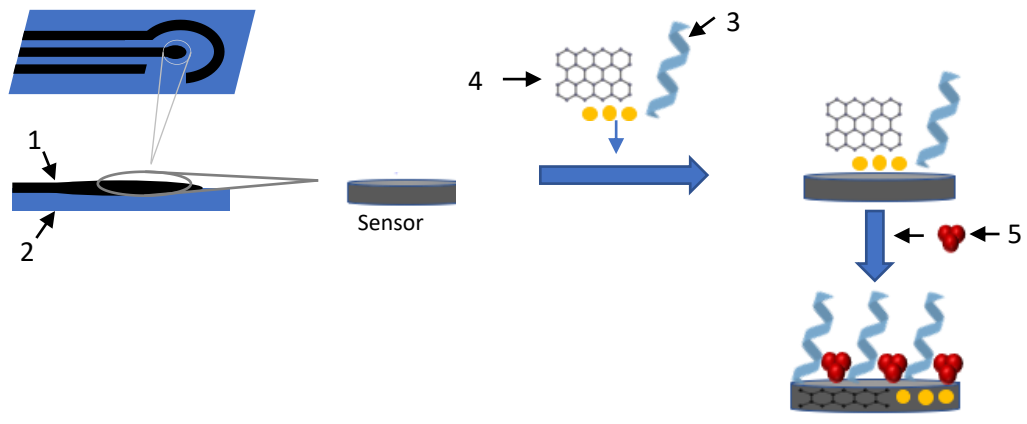
A)



B)



FIG. 2



Dispositivo imunossensores eletroquímico terminado

FIG. 3

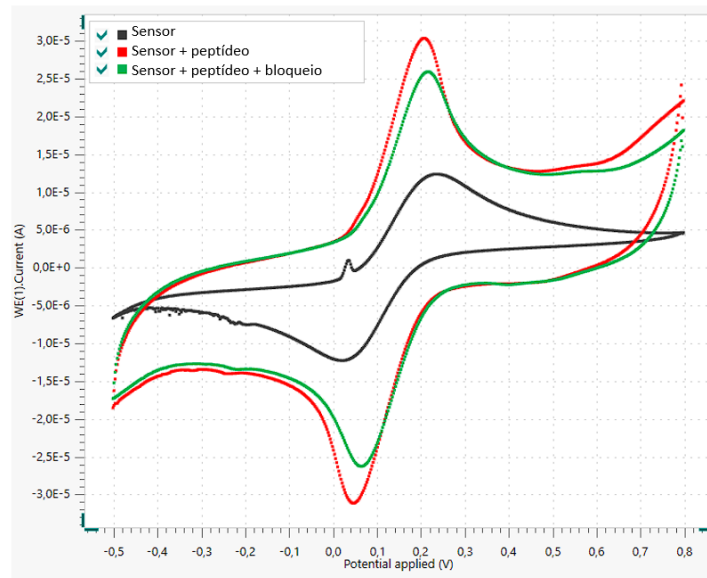


FIG. 4

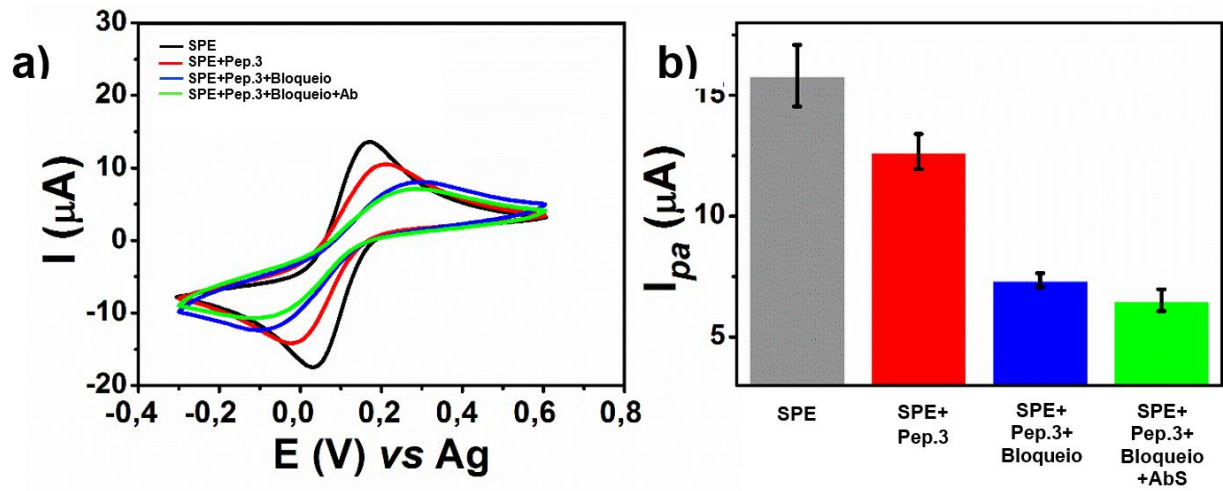


FIG. 5

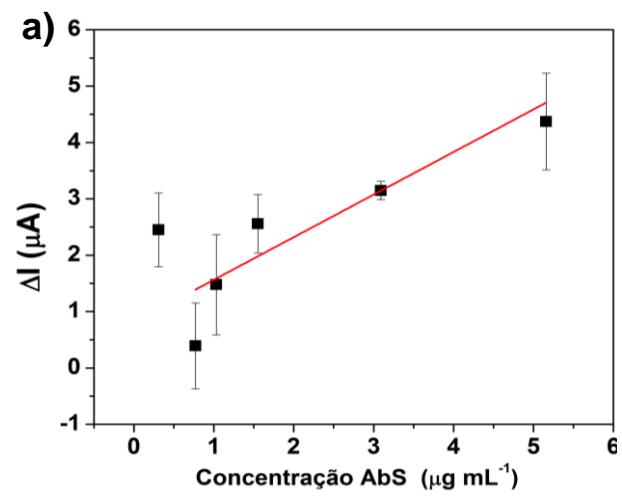


FIG. 6

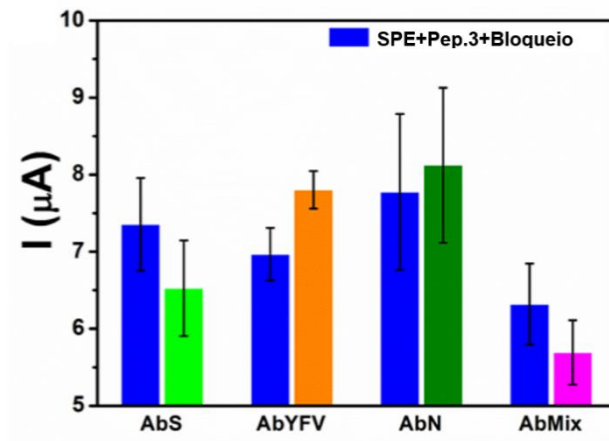


FIG. 7

