

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2015/097654 A1

(43) Data de Publicação Internacional
2 de Julho de 2015 (02.07.2015)

WIPO | PCT

(51) Classificação Internacional de Patentes :
C07K 7/06 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :

PCT/IB2014/067243

(22) Data do Depósito Internacional :

22 de Dezembro de 2014 (22.12.2014)

(25) Língua de Depósito Internacional :

Português

(26) Língua de Publicação :

Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :

BR1020130336270

27 de Dezembro de 2013 (27.12.2013)

BR

(71) Requerente : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS - UFMG [BR/BR]; Avenida Antônio Carlos,
6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2012.
Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte (BR).

(72) Inventores : BARTHOLOMEU, Daniella Castanheira;
Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II,
2º andar, sala 2012. Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte
(BR). SOUZA, Daniel Menezes; Avenida Antônio Carlos,
6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2012.
Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte (BR). MENDES,
Tiago Antônio De Oliveira; Avenida Antônio Carlos,
6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2012.
Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte (BR). FUJIWARA,
Ricardo Toshio; Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade
Administrativa II, 2º andar, sala 2012. Pampuha., 31270-
901 Belo Horizonte (BR). DELFIN CHÁVEZ

OLÓRTEGUI, Carlos; Avenida Antônio Carlos, 6627,
Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2012. Pampuha.,
31270-901 Belo Horizonte (BR).

(72) Inventor : MATOS SANTORO, Marcelo (falecido).

(72) Inventor : SILVANO OLIVEIRA, Jamil; Avenida
Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar,
sala 2012. Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte (BR).

(74) Mandatário : DE CASTRO LEITE GORI, Ana Luiza;
Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II,
2º andar, sala 2012. Pampuha., 31270-901 Belo Horizonte
(BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : SYNTHETIC PEPTIDES, METHOD AND KIT FOR IMMUNODIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL
LEISHMANIASIS, AND HUMAN CUTANEOUS AND VISCERAL LEISHMANIASIS

(54) Título : PEPTÍDEOS SINTÉTICOS, MÉTODO E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA E DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTAR E VISCERAL HUMANA

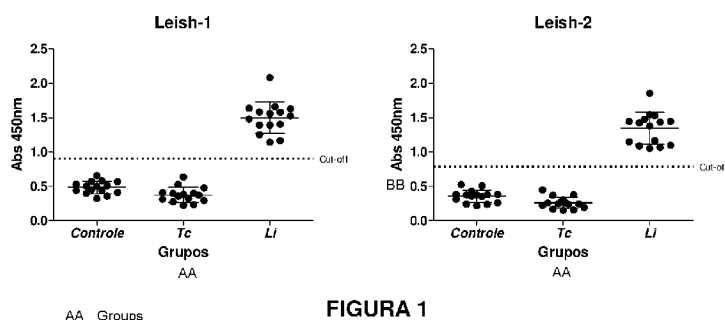


FIGURA 1

(57) Abstract : The present invention describes peptides, a method and a kit for the immunodiagnosis of leishmaniasis, a disease caused by protozoa of the Leishmania genus, either the infection and/or the disease, in human beings and/or dogs. The invention relates to the synthesis and use of peptides derived from B cell epitopes for identifying people and animals infected with visceral and cutaneous leishmaniasis, and aims at developing a diagnostic method and kit having higher specificity, allowing the reactivity of serological tests to be improved.

(57) Resumo : A presente invenção descreve peptídeos, um método e Kit para imunodiagnóstico das leishmanioses, doença causada por protozoários do gênero Leishmania, seja a infecção e/ou a doença, em seres humanos e/ou cães. A invenção trata da síntese e uso de peptídeos derivados de epítopos de célula B na identificação de indivíduos e animais infectados por leishmaniose visceral e tegumentar, visando o desenvolvimento de um método diagnóstico e um Kit diagnóstico com maior especificidade, permitindo o aperfeiçoamento da reatividade dos testes sorológicos.



WO 2015/097654 A1



CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- *antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de receção de tais modificações (Regra 48.2(h))*
- *com listagem de sequências, parte da descrição (Regra 5.2(a))*

Publicado:

- *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

Peptídeos sintéticos, Método e Kit para Imunodiagnóstico da Leishmaniose visceral canina e das Leishmanioses tegumentar e visceral humana

[001] A presente invenção descreve peptídeos, um método e Kit para imunodiagnóstico das leishmanioses, doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, seja a infecção e/ou a doença, em seres humanos e/ou cães. A invenção trata da síntese e uso de peptídeos derivados de epitopos de célula B na identificação de indivíduos e animais infectados por leishmaniose visceral e tegumentar, visando o desenvolvimento de um método diagnóstico e um Kit diagnóstico com maior especificidade, permitindo o aperfeiçoamento da reatividade dos testes sorológicos.

[002] Doenças infecciosas causadas por protozoários continuam a ser uma das maiores causas de mortalidade em países pobres e em desenvolvimento (WHO. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2007/np16/en/>>. Acesso em: 9 Feb. 2011). As leishmanioses, causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, estão presentes em 88 países e amplamente distribuídas na América Latina e Brasil, com estimativas de 12 milhões de pessoas infectadas, sendo consideradas entre as dez doenças infecciosas de maior impacto para a saúde pública e como uma das principais doenças negligenciadas presente em países em desenvolvimento.

[003] O uso de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos no diagnóstico das leishmanioses têm sido preferencialmente usados em substituição a lisados do parasito. Essas novas metodologias possuem maior reprodutibilidade dos resultados e eliminação de etapas que envolvem a manutenção e processamento de parasitos vivos (Frasch AC *et al.* Parasitol Today. 1991 Jun;7(6):148-51; Da-Silveira JF *et al.* Trends Parasitol. 2001 Jun;17(6):286-91; Meira WS *et al.* J Clin Microbiol. 2002 Oct;40(10):3735-40).

[004] No estado da técnica foram encontrados documentos de patente que sugerem o uso de peptídeos no diagnóstico de leishmanioses, como exemplos, o documento PI1020120335522 e PI1320120335599 que descrevem o uso de polipeptídeos derivados do proteoma de *Leishmania infantum* para o diagnóstico da infecção. No entanto, todos os documentos encontrados no estado da

técnica, dentre os quais se encontram os acima citados, apresentam peptídeos diferenciados dos apresentados nessa invenção e, ainda, não permitem um diagnóstico tão eficaz, através do qual se faz a distinção de outras infecções causadas por parasitos presentes em áreas endêmicas para leishmaniose visceral canina, como as espécies de protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Babesia canis*, assim como infecções bacterianas causadas *Ehrlichia canis*, como na presente tecnologia. Assim, apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, os métodos de diagnóstico disponíveis das leishmanioses ainda possuem diversas limitações. Além disso, na ausência de métodos de diagnóstico efetivos, a eficiência do tratamento e de qualquer iniciativa de bloqueio da transmissão ou vacinação fica comprometida (Ministério da Saúde. Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso. Brasília. 2006).

[005] Apesar da extensiva busca em desenvolver imunobiológicos para testes de diagnósticos mais sensíveis e específicos contra leishmanioses, ainda são necessárias melhorias na eficácia destes métodos em diagnosticar a doença em todos hospedeiros envolvidos no ciclo de vida do parasito. Assim, a presente invenção apresenta uma alternativa para solucionar este problema. Trata-se de peptídeos sintéticos desenhados a partir de epitópos de linfócitos B preditos por imunoinformática e o uso dos mesmos em método e kit para diagnosticar leishmanioses em cães e/ou humanos.

BREVE DESCRIÇÃO DA FIGURAS

[006] A Figura 1 apresenta gráficos comparativos referentes à reatividade humoral contra o peptídeo Leish-1 e Leish-2 em soro de cães de área endêmica para Leishmaniose Visceral Canina. O eixo X representa os grupos avaliados: cães não infectados (Controle, n = 15), cães infectados por *Trypanossoma cruzi* (Tc, n = 15) e cães infectados por *Leishmania infantum* (Li, n = 15). Já o eixo Y representa os valores médios de absorbância (450 nm) pela técnica de ELISA utilizando-se soros diluídos 1:100. O símbolo (*) significa *cut off* obtido pela curva ROC.

[007] A **Figura 2** apresenta um gráfico comparando as curvas ROC obtidas da ELISA para o peptídeo Leish-1 e Leish-2. Essas curvas foram utilizadas para

determinar o *cut off*, sensibilidade, especificidade e área abaixo da curva (AUC) da técnica de ELISA.

[008] A **Figura 3** apresenta a reatividade de pool de soros de cães infectados por *L. infantum* portadores da forma clínica assintomática e sintomática da LVC.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

[009] Na presente invenção foram identificados peptídeos conservados e polimórficos entre as diferentes espécies do gênero *Leishmania*, derivados de epitopos de célula B consistindo das sequências representadas pelas SEQ ID Nº1 e 2, modificados ou não em suas extremidades, visando contribuir para melhorar o sorodiagnóstico da Leishmaniose visceral canina e das Leishmanioses tegumentar e visceral humana. O método para imunodiagnóstico de leishmaniose pode ser selecionado do grupo compreendendo ELISA, Western blot, dot blot, imunodifusão, imunocromatografia e apresentar os seguintes passos:

- a) ligação de anticorpos antileishmaniais de uma amostra a um ou mais polipeptídeos consistindo das sequências de aminoácidos SEQ ID Nºs 1 e 2, ligados a um suporte sólido ou um carreador, preferencialmente partícula de ouro;
- b) contactar os anticorpos do passo (a) com um anticorpo secundário ou uma proteína (proteína A ou G), conjugados a uma enzima ou a um marcador e que se ligam aos anticorpos do passo (a); sendo que as enzimas podem ser selecionada do grupo compreendendo fosfatase alcalina, peroxidase, β -galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase e o marcador pode ser selecionado do grupo compreendendo enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes;
- c) detectar os anticorpos antileishmaniais na amostra supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligados ao dito anticorpo anti-leishmanial.

[0010] O método pode ser realizado utilizando-se amostras de sangue, soro, plasma ou outro fluído corporal do animal ou humano infectado.

[0011] A tecnologia compreende ainda um Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses que compreende os peptídeos consistindo das sequências SEQ ID N^{os} 1 e 2 associados ou isolados e um anticorpo secundário ou uma proteína (proteína A ou G), onde o anticorpo secundário ou a proteína está conjugado a um enzima (como fosfatase alcalina, peroxidase, β -galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase) ou marcador (como enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes) , e um reagente para detectar a dita enzima ou marcador. No Kit as proteínas recombinantes ou os peptídeos estarão ligados a um suporte sólido ou carreador, sendo que esse suporte sólido poderá ser de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e poliestireno e o carreador consistir de partículas de ouro.

[0012] A técnica de ELISA foi escolhida na presente invenção por ser menos invasiva, de fácil execução e automação, permitindo estudos e aplicação em grande número de amostras.

[0013] A presente invenção pode ser melhor compreendida, mas de modo não limitante, com os exemplos a seguir.

Exemplo 1 - Identificação *in silico* de epitopos lineares de células B

[0014] Inicialmente, epitopos lineares de célula B foram preditos em todo o proteoma da cepa M2904 de *Leishmania braziliensis* utilizando o programa BepiPred (Larsen JE, Lund O e Nielsen M. Immunome Res. 2006 Apr 24;2:2). Nesta análise foi utilizada uma abordagem conservativa com valor de corte igual a 1.3 que fornece 96% de especificidade e 13 % de sensibilidade, minimizando a seleção de muitos epitopos falso-positivos. Sequências com o somatório dos scores de polimorfismo acima de 6 e score médio de predição do Bepipred acima de 1.3 foram consideradas como epitopos polimórficos. Sequências de 15 aminoácidos com score médio de predição de epitopo igual entre as duas sequências e acima de 1.3 e score de polimorfismo igual a zero foram considerados epitopos conservados. Para minimizar a chance de reação cruzada com outros parasitos filogeneticamente relacionados, sequências de peptídeos com alta similaridade com proteínas de outros parasitos foram identificadas utilizando o algoritmo BLAST (Altschul SF et al. J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10) e descartadas. A versão do algoritmo denominada blastp foi

utilizada para comparar epitopos polimórficos e conservados com o proteoma predito de *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major* e *T. cruzi*. Epitopos com mais de 70% de identidade ao longo de mais de 70% da sequência foram eliminados das análises subsequentes.

Os peptídeos foram sintetizados em membrana de celulose pela técnica spot síntese.

Exemplo 2 - Síntese dos peptídeos solúveis

[0015] Os peptídeos selecionados foram sintetizados em fase sólida pelo método de N-9-fluorenilmetoxycarbonil (Wellings DA e Atherton E. Methods Enzymol. 1997;289:44- 67) na escala de 20-30 umol. Toda síntese foi realizada no equipamento PSSM8. Fmoc-aminoácidos foram ativados por 30-60 minutos com 1 equivalente de HOBT e 2 equivalentes de DIC. Após este tempo, os aminoácidos ativados foram colocados em contato com a resina Rink amidada com grau de substituição de 0,61 por 45-60 minutos. Os grupos Fmoc foram então removidos com solução de 4-metilpiperidina 25%. A ativação, incorporação na resina e desproteção do grupo Fmoc foram então repetidas até síntese completa da cadeia dos peptídeos. Após a síntese, os peptídeos foram clivados da resina juntamente com a desproteção da cadeia lateral com uma mistura contendo 9,4% de TFA, 2,4% de água e 0,1% de triisopropilsilano. O peptídeo foi precipitado do material bruto com éter diisopropílico por 16 horas a 4 °C, seguido de centrifugação a 3000 G por 5-10 minutos. Os peptídeos sintetizados, Leish-1 (VRDPAPQFS) e Leish-2 (TPGKPTLDT), foram purificados por cromatografia em fase reversa utilizando-se a coluna Sephasil Peptide C18 (Shimadzu) acoplada a sistema de HPLC (Shimadzu) utilizando-se um gradiente de 0 a 25% de acetonitrila durante 75-90 minutos com 0–10 minutos até 10% de acetonitrila. Após a purificação, os peptídeos foram submetidos à espectrometria de massa em equipamento Autoflex Speed MALDI/TOF (Bruker) para confirmação de sua massa molecular.

Exemplo 3 - Validação dos peptídeos frente a soro de cães infectados

[0016] Ensaios de ELISA foram realizados para validar e caracterizar a

reatividade dos peptídeos frente a parasitos do gênero *Leishmania*. Foram testados soros de cães infectados. Os ensaios foram realizados em placas de PVC flexível de 96 poços (Costar). Cada poço foi sensibilizado com 2 µg de peptídeo sintético. Após a sensibilização, a placa foi bloqueada com PBS acrescido de 1,0-5,0% de BSA durante 30-60 minutos, a 25-37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, 50-100 µL dos soros diluídos 1:100 em PBS com 1,0-2,5% de BSA foram adicionados aos poços e incubados a 25-37°C por 30-60 minutos. As placas foram lavadas 4 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e, em seguida, foi adicionado aos poços 50-100 µL do anticorpo anti-IgG humano ou canino diluído 1:2000 em PBS-BSA 1,0-2,5%. Após incubação a 37°C por 30-60 minutos, as placas foram novamente lavadas por quatro vezes com a solução de lavagem, e 100 µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1 M, Na₂PO₄ 0,2 M, TMB 0,05% e H₂O₂ 0,1% foram adicionados. As placas foram incubadas a 25-37°C ao abrigo de luz por 10 a 30 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50-100 µL de H₂SO₄ 2M. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 450 nm.

[0017] Avaliando os dados obtidos (**Figuras 1 e 2**), a ELISA utilizando os peptídeos Leish-1 e Leish-2 apresentou excelente desempenho na capacidade simultânea de detectar resultados positivos e negativos, avaliados pela sensibilidade e especificidade (ELISA-Leish-1: 100,0% e 100,0%; ELISA-Leish-2: 100,0% e 100,0%; dados apresentados na Tabela 1). O ganho de sensibilidade obtido pelas ELISA-Leish-1 e ELISA-Leish-2, possivelmente devido a fato destes peptídeos apresentarem epitopos com alta imunogenicidade, é importante para prevenir a manutenção de cães infectados (LVC) em áreas endêmicas, bem como evitar o sacrifício desnecessário de animais por limitações na especificidade do teste devido à infecção por outros microrganismos, resultando em resultados falsos positivos, comumente observados em testes de diagnósticos que utilizam antígeno bruto do parasito. Avaliando a AUC, observou-se que os testes ELISA-Leish-1 e ELISA-Leish-2 apresentou área d e 1,00, indicando qu não houve incidência de resultados falsos positivos e falsos negativos, sendo então, eficiente em discriminar

indivíduos doentes de sadios.

[0018] Conforme descrito na **Tabela 1**, o resultado dos valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) apresentaram elevados, assim como a razão de probabilidade positiva (LR+) e negativa (LR-), sendo assim, a probabilidade de um resultado positivo ou negativo obtido pela ELISA-Leish-1 e ELISA-Leish-2 está correto é elevada. Em adição, o valor para o índice de Youden da ELISA-Leish-1 e ELISA-Leish-2 serem igual a 1 indicam menor proporção total de erros de classificação no diagnóstico, classificando como uma excelente opção para diagnóstico da LVC.

Tabela 1: Performance de diagnóstico em amostras de soro de cães portadores de LVC utilizando Leish-1 e Leish-2.

Teste	Se (%)	Ep (%)	AUC	VPP	VPN	J
Leish-1	100,00	100,00	1,0000	100,00	100,00	1,0000
Leish-2	100,00	100,00	1,0000	100,00	100,00	1,0000

Abreviações: Se: sensibilidade; Ep: especificidade; AUC: área abaixo da curva; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; RP+ (Razão de probabilidade positiva); RP- (Razão de probabilidade negativa); J: Índice Youden.

[0019] A **Figura 3** apresenta a reatividade de pool de soros de cães infectados por *L. infantum* portadores da forma clínica assintomática e sintomática da LVC. Nesta etapa, os peptídeos Leish-1 e Leish-2 foram capazes de identificar em 100% os cães infectados independente do estado clínico. Além disso, está demonstrada a reatividade cruzada de soros de cães portadores de outras infecções presentes em área endêmica além de soro de cães negativos frente aos peptídeos Leish-1 e Leish-2. Nesta etapa, os soros dos cães apresentaram reatividade contra os peptídeos abaixo do cut-off, indicando não reatividade cruzada e especificidade de 100%. Os dados de performance estão apresentados de forma detalhada na **Tabela 2**.

Tabela 2: Performance de diagnóstico em pool de amostras de soro de cães positivos para *L. infantum* utilizando Leish-1 e Leish-2 e análise da reatividade cruzada com cães negativos para *L. infantum* e portadores de outras infecções presentes em áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral Canina.

[illegible]

Abreviações: Li-A: *L. infantum* positivo assintomático; Li-S: *L. infantum* positivo sintomático; Tc: *Trypanosoma cruzi* positivo; Ec: *Ehrlichia canis* positivo; Bc: *Babesia canis* positivo; Cn-AE: Controle negativo área endêmica; Cn-ANE: Controle negativo área não endêmica.

[0020] A reação de ELISA-Leish-1 e ELISA-Leish-2 mostrou-se útil e eficiente em identificar corretamente os cães não infectados e os cães infectados. Estes dados permitem concluir pela validade das reações sorológicas utilizadas para o diagnóstico sorológico da LVC.

REIVINDICAÇÕES

- 1. Peptídeos sintéticos** caracterizados por compreenderem as sequências representadas pelas SEQ ID N^o1 e 2.
- 2. Uso dos peptídeos sintéticos** caracterizado por ser no diagnóstico da Leishmaniose visceral canina e das Leishmanioses tegumentar e visceral humana.
- 3. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses** caracterizado por compreender:
 - a) ligação de anticorpos antileishmaniais de uma amostra a um ou mais polipeptídios consistindo das sequências de aminoácidos SEQ ID N^{os} 1 e 2, ligados a um suporte sólido ou 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 antileishmaniais na amostra supracitada pela detecção do anticorpo secundário ou proteína especificamente ligados ao dito anticorpo anti-leishmanial.
- 4. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses**, de acordo com a reivindicação 3, passo “a”, caracterizado pelos polipeptídeos SEQ ID N^{os} 1 e 2 poderem ser modificados em suas extremidades.
- 5. Método para teste Imunodiagnóstico das leishmanioses**, de acordo com a reivindicação 3, passo “a”, caracterizado pelas amostras serem selecionadas do grupo consistindo de sangue, soro, plasma e outro fluído corporal.
- 6. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses**, de acordo com a reivindicação 3, passo “a”, caracterizado pelo carreador ser uma partícula de ouro.
- 7. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses**, de acordo com a reivindicação 3, passo “b”, caracterizado pela proteína ser selecionada do grupo consistindo de proteína A e proteína G.
- 8. Método para teste Imunodiagnóstico das leishmanioses**, de acordo com a reivindicação 3, passo “b”, caracterizado pela enzima ser selecionada do grupo

consistindo de fosfatase alcalina, peroxidase, β -galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase.

9. Método para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 3, passo “b”, caracterizado pelo marcador ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.

10. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, caracterizado por compreender:

- a. os peptídeos consistindo das sequências SEQ ID N^{os} 1 e 2 associados ou isolados;
- b. Um anticorpo secundário ou uma proteína, onde o anticorpo secundário ou a proteína está conjugado a um enzima ou marcador, e um reagente para detectar a dita enzima ou marcador.

11. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelas proteínas recombinantes ou os peptídeos estarem ligados a uma suporte sólido ou carreador.

12. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo suporte sólido ser selecionado do grupo de material consistindo de nitrocelulose, nylon, látex, polipropileno e polistireno.

13. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo carreador consistir de partículas de ouro.

14. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela proteína ser selecionada do grupo consistindo de proteína A e proteína G.

15. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo dito marcador ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.

16. Kit para teste imunodiagnóstico das leishmanioses, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela enzima ser selecionada do grupo compreendendo fosfatase alcalina, peroxidase, β -galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase.

FIGURAS

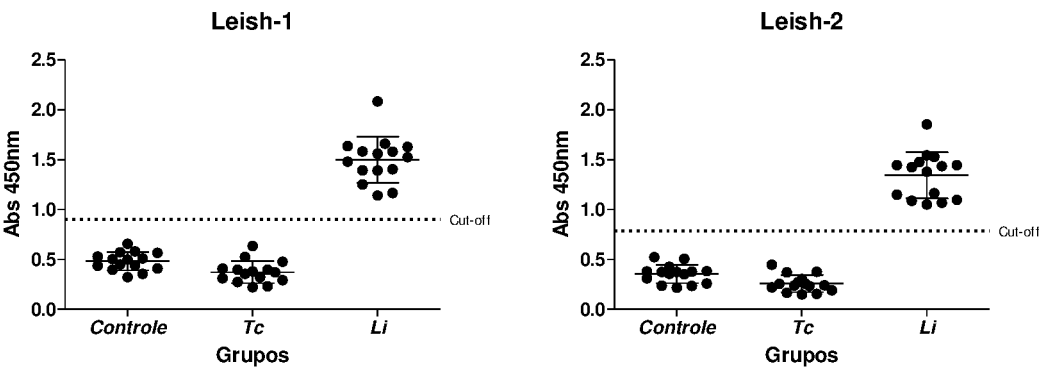


FIGURA 1

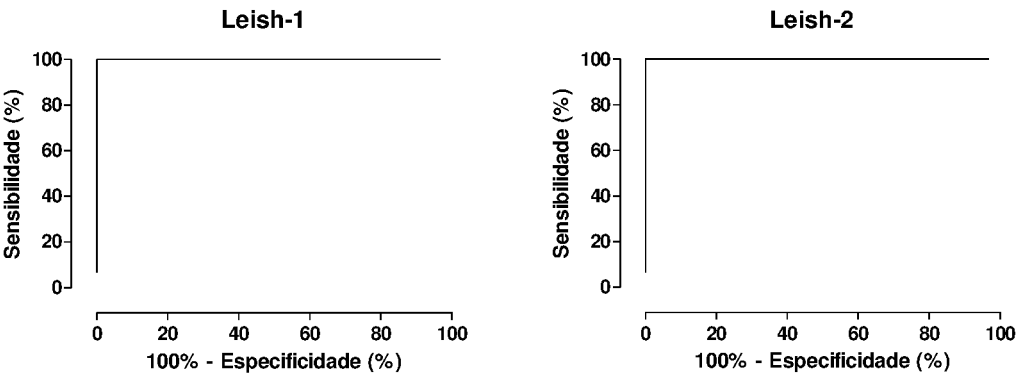


FIGURA 2

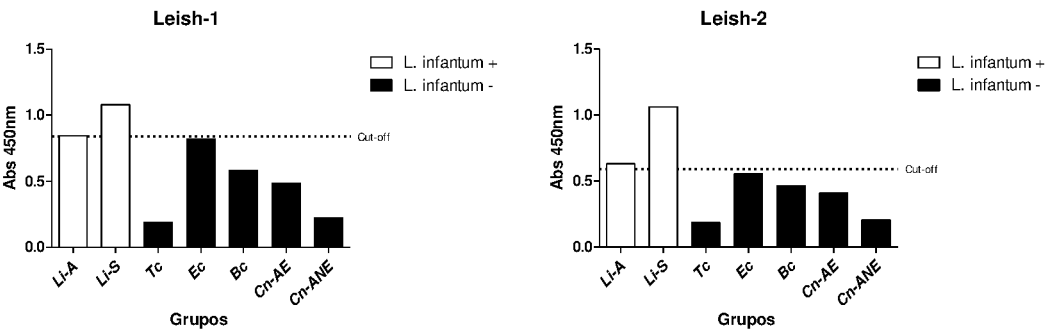


FIGURA 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2014/067243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/06 (2006.01), G01N33/569 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Banco de patentes INPI (Brasil)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC; MEDLINE®; SequenceBase®BLAST®; Immunology Abstracts; SciSearch®

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MENEZES-SOUZA D et al. "Epitope Mapping of the HSP83.1 Protein of <i>Leishmania braziliensis</i> Discloses Novel Targets for Immunodiagnosis of Tegumentary and Visceral Clinical Forms of Leishmaniasis", Clin Vaccine Immunol., Vol. 21, No. 7, July 2014, pg. 949-959. ISSN: 1556-6811 doi: 10.1128/CVI.00151-14	2
P,A	see the whole document	1, 3-16
X	----- DATABASE GenBank [Online] 01 June 2012 (01.06.2012) "peroxidoxin [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]"	1
A	Database accession no. XP_001562236 see the whole document	2-16
X	----- FARIA A R et al. "High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis", PLoS Negl Trop Dis. Vol. 5, No. 9, September 2011, e1310. ISSN: 1935-2735	2
A	doi: 10.1371/journal.pntd.0001310 see the whole document	1, 3-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18/05/2015

Date of mailing of the international search report

21/05/2015



INSTITUTO NACIONAL DA
 PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Rua Sao Bento nº 1, 17º andar
 cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ
 Nº de fax: +55 21 3037-3663

Authorized officer

Juliana Manasfi Figueiredo

Telephone No.

+55 21 3037-3493/3742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2014/067243

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	COSTA M M et al. "Analysis of Leishmania chagasi by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine", J Proteome Res., Vol. 10, No. 5, May 2011, pg. 2172-2184. ISSN: 1535-3893 doi: 10.1021/pr101286y see the whole document	2 1, 3-16
X A	----- BR PI1005033 A2 (UNIV MINAS GERAIS [BR]) 02 April 2013 (02.04.2013) see the whole document	2 1, 3-16
X A	----- BR PI1006646 A2 (UNIV MINAS GERAIS [BR]) 17 April 2012 (17.04.2012) see the whole document	2 1, 3-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2014/067243

BR PI1005033 A2	2013-04-02	None	
BR PI1006646 A2	2012-04-17	WO 2012019268 A2	2012-02-16

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

C07K 7/06 (2006.01), G01N33/569 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C07K G01N

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Banco de patentes INPI (Brasil)

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC; MEDLINE®; SequenceBase®BLAST®; Immunology Abstracts; SciSearch®

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
P,X	MENEZES-SOUZA D et al. "Epitope Mapping of the HSP83.1 Protein of Leishmania braziliensis Discloses Novel Targets for Immunodiagnosis of Tegumentary and Visceral Clinical Forms of Leishmaniasis", Clin Vaccine Immunol., Vol. 21, No. 7, Julho 2014, pg. 949-959. ISSN: 1556-6811 doi: 10.1128/CVI.00151-14 * ver documento inteiro *	2
P,A	----- DATABASE GenBank [Online] 01 Junho 2012 (2012-06-01), "peroxidoxin [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]" Database accession no. XP_001562236 * ver documento inteiro *	1, 3-16
X	----- FARIA A R et al. "High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis", PLoS Negl Trop Dis. Vol. 5, No. 9, Setembro 2011, e1310. ISSN: 1935-2735 doi: 10.1371/journal.pntd.0001310 * ver documento inteiro *	1
A	----- FARIA A R et al. "High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis", PLoS Negl Trop Dis. Vol. 5, No. 9, Setembro 2011, e1310. ISSN: 1935-2735 doi: 10.1371/journal.pntd.0001310 * ver documento inteiro *	2-16
X	----- FARIA A R et al. "High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis", PLoS Negl Trop Dis. Vol. 5, No. 9, Setembro 2011, e1310. ISSN: 1935-2735 doi: 10.1371/journal.pntd.0001310 * ver documento inteiro *	2
A	----- FARIA A R et al. "High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis", PLoS Negl Trop Dis. Vol. 5, No. 9, Setembro 2011, e1310. ISSN: 1935-2735 doi: 10.1371/journal.pntd.0001310 * ver documento inteiro *	1, 3-16

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C☒ Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

18/05/2015

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

21/05/2015

Nome e endereço postal da ISA/BR


 INSTITUTO NACIONAL DA
 PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Rua São Bento nº 1, 17º andar
 cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Nº de fax:

+55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

Juliana Manasfi Figueiredo

Nº de telefone:

+55 21 3037-3493/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
<p>X</p> <p>A</p>	<p>COSTA M M et al. "Analysis of Leishmania chagasi by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine", J Proteome Res., Vol. 10, No. 5, Maio de 2011, pg. 2172-2184. ISSN: 1535-3893 doi: 10.1021/pr101286y * ver documento inteiro *</p> <p>-----</p>	<p>2</p> <p>1, 3-16</p>
<p>X</p> <p>A</p>	<p>BR PI1005033 A2 (UNIV MINAS GERAIS [BR]) 02 abril 2013 (2013-04-02) * ver documento inteiro *</p> <p>-----</p>	<p>2</p> <p>1, 3-16</p>
<p>X</p> <p>A</p>	<p>BR PI1006646 A2 (UNIV MINAS GERAIS [BR]) 17 abril 2012 (2012-04-17) * ver documento inteiro *</p>	<p>2</p> <p>1, 3-16</p>

Informação relativa a membros da família da patentes

PCT/IB2014/067243

Formulário PCT/ISA/210 (anexo da família de patentes) (Julho 2009)

An official website of the United States government

[Here's how you know](#)

Log in

Protein

GenPept

peptidoglycan-associated lipoprotein [Variovorax paradoxus EPS]

GenBank: ADU39323.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS ADU39323 167 aa linear BCT 31-DEC-2013
DEFINITION peptidoglycan-associated lipoprotein [Variovorax paradoxus EPS].
ACCESSION ADU39323
VERSION ADU39323.1
DBLINK BioProject: [PRJNA43457](#)
BioSample: [SAMN00149467](#)
DBSOURCE accession [CP002417.1](#)
KEYWORDS .
SOURCE Variovorax paradoxus EPS
ORGANISM [Variovorax paradoxus EPS](#)
Bacteria; Pseudomonadota; Betaproteobacteria; Burkholderiales;
Comamonadaceae; Variovorax.
REFERENCE 1 (residues 1 to 167)
AUTHORS Han,J.I., Spain,J.C., Leadbetter,J.R., Ovchinnikova,G.,
Goodwin,L.A., Han,C.S., Woyke,T., Davenport,K.W. and Orwin,P.M.
TITLE Genome of the Root-Associated Plant Growth-Promoting Bacterium
Variovorax paradoxus Strain EPS
JOURNAL Genome Announc 1 (5), e00843-13 (2013)
PUBMED [24158554](#)
REMARK Publication Status: Online-Only
REFERENCE 2 (residues 1 to 167)
AUTHORS Lucas,S., Copeland,A., Lapidus,A., Cheng,J.-F., Goodwin,L.,
Pitluck,S., Teshima,H., Detter,J.C., Han,C., Tapia,R., Land,M.,
Hauser,L., Kyrpides,N., Ivanova,N., Ovchinnikova,G., Orwin,P.,
Han,J.-I.G. and Woyke,T.
CONSRTM US DOE Joint Genome Institute
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (22-DEC-2010) US DOE Joint Genome Institute, 2800
Mitchell Drive B310, Walnut Creek, CA 94598-1698, USA
COMMENT Method: conceptual translation.
FEATURES Location/Qualifiers
- source 1..167
- /organism="Variovorax paradoxus EPS"
/strain="EPS"
/db_xref="taxon:[595537](#)"

Protein 1..167
 /product="peptidoglycan-associated lipoprotein"
sig_peptide 1..22
 /note="Signal predicted by SignalP 3.0 HMM (Signal peptide probability 0.999) with cleavage site probability 0.785 at residue 22"
Region 63..166
 /region_name="OmpA_C-like"
 /note="Peptidoglycan binding domains similar to the C-terminal domain of outer-membrane protein OmpA; cl30079"
 /db_xref="CDD:453091"
Site order(68..69,102..103,106,110..111,114,156,160)
 /site_type="other"
 /note="ligand binding site [chemical binding]"
 /db_xref="CDD:143586"
CDS 1..167
 /locus_tag="Varpa_5167"
 /coded_by="complement(CP002417.1:5620544..5621047)"
 /inference="protein motif:TFAM:TIGR02802"
 /note="KEGG: vap:Vapar_4460 peptidoglycan-associated lipoprotein;
 TIGRFAM: peptidoglycan-associated lipoprotein;
 PFAM: OmpA/MotB domain protein"
 /transl_table=11
 /db_xref="InterPro:IPR006664"
 /db_xref="InterPro:IPR006665"
 /db_xref="InterPro:IPR014169"

ORIGIN

```

1 mkknfrilai valgaslaac stpksgrrda tyyysnkgaa avakvepppp aavqngpagv
61 pkivyfdfdk ynirpqdqri veahasflkn rstsrvvieg ht dsnggrey nlalgqrrse
121 svqraltqlg vpaerveais wgiekpasme tteegyqlnr raefsy

```

//