



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018016140-7 A2



(22) Data do Depósito: 07/08/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 08/12/2020

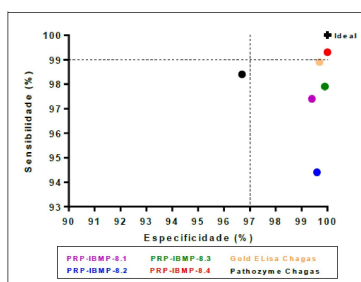
(54) **Título:** PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, SEQUÊNCIA DE DNA SINTÉTICO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, COMPOSIÇÃO, USO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, KIT PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS, E, MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

(51) **Int. Cl.:** C12N 15/30; C12N 15/62; C12N 15/70; G01N 33/569.

(71) **Depositante(es):** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ; INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ - IBMP.

(72) **Inventor(es):** NILSON IVO TONIN ZANCHIN; MARCO AURÉLIO KRIEGER; FRED LUCIANO NEVES SANTOS; LEONARDO FOTI; PAOLA ALEJANDRA FIORANI CELEDÓN.

(57) **Resumo:** PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, SEQUÊNCIA DE DNA SINTÉTICO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, COMPOSIÇÃO, USO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, KIT PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS, E, MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS. A presente invenção refere-se a uma proteína recombinante ou sintética com atividade imunogênica, útil para detecção de anticorpos anti-Trypanosoma cruzi na fase crônica da doença de Chagas. A invenção também se refere à sequência de DNA sintético, cassete de expressão, vetor de expressão, célula hospedeira, método de produção da proteína recombinante ou sintética, composição, uso da proteína recombinante ou sintética, kit para diagnóstico da doença de chagas, bem como ao método para diagnóstico da doença de chagas.



“PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, SEQUÊNCIA DE DNA SINTÉTICO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, COMPOSIÇÃO, USO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, KIT PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS, E, MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS”

### **Campo da Invenção**

[001] A presente invenção refere-se a uma proteína recombinante ou sintética com atividade imunogênica, útil para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença de Chagas. A invenção também se refere à sequência de DNA sintético, cassete de expressão, vetor de expressão, célula hospedeira, método de produção da proteína recombinante ou sintética, composição, uso da proteína recombinante ou sintética, kit para diagnóstico da doença de chagas, bem como ao método para diagnóstico da doença de chagas.

### **Antecedentes da Invenção**

[002] A doença de Chagas é uma zoonose provocada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), cuja via de transmissão clássica ocorre por meio de insetos hematófagos popularmente chamados de barbeiros, os quais eliminam as formas infectantes nas fezes e urina após realização do repasto sanguíneo. Estima-se atualmente que mais de cinco milhões de indivíduos sejam acometidos pela doença em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015), havendo 12.000 a 14.000 óbitos anuais em 21 países das Américas (HOTEZ et al., 2012; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2014). Movimentos migratórios de indivíduos infectados de áreas endêmicas para países indenes do Pacífico Ocidental, da Europa, Oceania, e da América do Norte têm se tornado constantes e responsáveis pela expansão da doença para além das

fronteiras da América Latina (COURA; VIÑAS, 2010). Dessa forma, há necessidade da elaboração de testes laboratoriais capazes de diagnosticar as diferentes linhagens do parasita circulantes nas diversas regiões geográficas.

[003] A doença é bifásica e caracterizada por uma fase aguda e uma fase crônica. Na fase aguda, devido a uma alta parasitemia, o diagnóstico etiológico é obtido por métodos parasitológicos, enquanto que na fase crônica onde se observa uma baixa parasitemia aliada a um elevado título de anticorpos, a infecção é detectada no soro por meio de métodos imunológicos (GOMES,1997; GOMES et al, 2004).

[004] O diagnóstico laboratorial da doença de Chagas representa um grande desafio para a Saúde Pública, pois depende da fase da doença e dos testes utilizados. Na fase crônica, em virtude dos elevados níveis séricos de imunoglobulinas anti-*Trypanosoma cruzi* circulantes, as metodologias baseiam-se na interação antígeno-anticorpo, sendo a imunofluorescência indireta, a hemaglutinação indireta e o ensaio imunoenzimático (ELISA) as metodologias mais comumente utilizadas. Além destes, o Western blot, a radioimunoprecipitação (RIPA), a quimioluminescência, a imunocromatografia (testes rápidos), a aglutinação em partículas de látex, a citometria de fluxo e o microarranjo líquido já foram descritos na literatura como metodologias para o diagnóstico da doença de Chagas, bem como ferramentas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes.

[005] Devido ao grande polimorfismo intraespecífico observado para as linhagens do parasita (TIBAYRENC, 2003), e a incapacidade de um único teste fornecer parâmetros de desempenho seguros para firmar o diagnóstico laboratorial da infecção, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a utilização em paralelo de dois testes com diferentes metodologias (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). No Brasil, direcionamentos do Ministério da Saúde definem que o diagnóstico pode ser

realizado conforme o recomendado pela OMS ou utilizando dois testes com o mesmo princípio metodológico desde que possuam matrizes antigênicas distintas (BRASIL, 2005). Deste modo, resultados concordantes definem a condição sorológica de um indivíduo como negativo ou positivo. Por outro lado, resultados discordantes definem o estado sorológico como inconclusivo, devendo então buscar uma terceira alternativa metodológica para chegar a uma conclusão diagnóstica, levando em conta também as características clínico-epidemiológicas de cada indivíduo.

[006] A dificuldade de se obter um resultado preciso utilizando um único teste pode ser atribuída aos antígenos utilizados na fase sólida. Os kits sorológicos atualmente utilizados para o diagnóstico laboratorial da infecção causada pelo *T. cruzi* utilizam em sua matriz extratos totais ou antígenos brutos de cepas de *T. cruzi* que, em virtude de sua complexidade antigênica, resultam em problemas de padronização, baixa confiabilidade e possibilidade de reatividade cruzada com outros microrganismos, principalmente com espécies do gênero *Leishmania*, uma vez que o parasito *T. cruzi* compartilha similaridade com outras espécies de tripanosomatídeos (CORDERO et al., 2009; PAN et al., 1992; SANTOS et al., 2012).

[007] Na tentativa de diminuir estas limitações, antígenos recombinantes obtidos por meio de técnicas de engenharia genética passaram a compor a matriz antigênica dos testes diagnósticos. A avaliação de seu uso em sorodiagnóstico foi realizada por diferentes estudos, revelando elevados valores de sensibilidade e especificidade, sobretudo ausência de reação cruzada com outras patologias, uma vez que podem ser sintetizados a partir de sequências de DNA onde as regiões responsáveis por estas reações sejam identificadas e removidas (DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001; GOMES, LORENA, LUQUETTI, 2009; VERISSIMO DA COSTA et al., 2013). Alguns destes antígenos demonstraram possuir elevados parâmetros de desempenho por apresentarem em sua sequência repetições de aminoácidos

umentando, portanto, o seu reconhecimento pelo soro de indivíduos portadores da doença de Chagas, quando comparados aos extratos brutos do parasito (DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001). No entanto, os antígenos utilizados nem sempre são capazes de reconhecer cepas de diferentes regiões geográficas e devido à pouca variedade de epítomos (monotonia) apresentados por estes antígenos e ao elevado polimorfismo antigênico do *T. cruzi*, resultados falso-negativos continuaram a ser reportados (FRASCH et al., 1991).

[008] Há, portanto, uma necessidade na técnica por um imunoenensaio que permita o imunodiagnóstico da doença de Chagas crônica sem as limitações apresentadas pelos métodos e antígenos propostos pelo estado da técnica, como a impossibilidade de reconhecimento de cepas de diferentes regiões geográficas, reações falso-negativas, reações cruzadas e baixa sensibilidade.

### **Sumário da Invenção**

[009] Com a finalidade de solucionar o problema da técnica, foram aprimoradas matrizes antigênicas para métodos imunodiagnósticos da doença de Chagas Crônica com melhores desempenhos, possibilitando inclusive o reconhecimento de cepas de diferentes regiões geográficas do Brasil e do mundo.

[0010] Em um primeiro aspecto, a invenção provê uma proteína recombinante ou sintética, compreendendo pelo menos um fragmento de uma ou mais proteínas selecionadas do grupo de: fragmento do vetor, antígeno de superfície 2, trans-sialidase, proteína L19 de subunidade ribossomal 60S, calpaína cisteína peptidase, proteína de antígeno repetitivo flagelar, proteína associada ao microtúbulo de *Trypanosoma cruzi*, proteína de membrana citoplasmática, e opcionalmente ligadores ou espaçadores, em que um ou mais aminoácidos são opcionalmente substituídos, adicionados ou deletados em relação à sequência natural.

[0011] Em um segundo aspecto, a invenção provê sequências de DNA sintéticos que codificam a proteína recombinante ou sintética da invenção.

[0012] Em um terceiro aspecto, a invenção provê cassete de expressão, que compreende a sequência de DNA sintético da invenção.

[0013] Em um quarto aspecto, a invenção provê vetor de expressão, que compreende a sequência de DNA sintético descrita acima ou um cassete de expressão descrito acima.

[0014] Em um quinto aspecto, a invenção provê célula hospedeira, que compreende a sequência de DNA sintético como definida acima ou um vetor de expressão como definido acima ou um cassete de expressão como definido acima.

[0015] Em um sexto aspecto, a invenção provê método para produzir uma proteína recombinante ou sintética, que compreende:

(a) transferir para uma célula hospedeira a sequência de DNA sintético como definida acima para obter uma célula hospedeira transformada ou transfectada;

(b) cultivar a célula hospedeira transformada ou transfectada para obter uma cultura de células;

(c) expressar a proteína recombinante ou sintética como definido acima em uma célula hospedeira transformada ou transfectada para produzir uma proteína recombinante ou sintética; e

(e) isolar a proteína recombinante da célula ou da cultura de célula.

[0016] Em um sétimo aspecto, a invenção provê composição, que compreende uma proteína recombinante ou sintética como definida acima ou uma combinação de duas ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas definidas acima.

[0017] Em um oitavo aspecto, a invenção provê uso da proteína recombinante ou sintética da invenção, para a manufatura de uma composição

para diagnóstico de doença de Chagas.

[0018] Em um nono aspecto, a invenção provê kit para diagnóstico da doença de Chagas, que compreende uma ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas como definidas acima ou uma composição como definida acima.

[0019] Em um décimo aspecto, a invenção provê método para diagnóstico da Doença de Chagas, que compreende as etapas de:

(a) prover uma ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas como definida acima ou uma composição como definida acima;

(b) contatar as ditas uma ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas ou a dita composição com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/ antígeno; e

(c) detectar o complexo antígeno/ anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/ anticorpo.

### **Breve descrição das figuras**

[0020] **Figura 1:** SDS-PAGE das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) corados pelo azul de Coomassie R250.

[0021] **Figura 2:** Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) em diferentes sistemas-tampão.

[0022] **Figura 3:** Análise gráfica dos valores médios de absorvância da proteína IBMP-8.1 com diluição sérica de 25, 50, 100 e 200 vezes.

[0023] **Figura 4:** Análise gráfica dos valores médios de absorvância da proteína IBMP-8.1 com diluição sérica de 100 e 200 vezes.

[0024] **Figura 5:** Análise gráfica dos valores médios de absorvância da proteína IBMP-8.2 com diluição sérica de 100 e 200 vezes.

[0025] **Figura 6:** Análise gráfica dos valores médios de absorvância da proteína IBMP-8.3 com diluição sérica de 100 e 200 vezes.

[0026] **Figura 7:** Análise gráfica dos valores médios de absorvância

da proteína IBMP-8.4 com diluição sérica de 100 e 200 vezes.

[0027] **Figura 8:** Análise gráfica dos índices de reatividade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) utilizando SFB e BSA.

[0028] **Figura 9:** Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular obtidos da avaliação de estabilidade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) a temperaturas extremas.

[0029] **Figura 10:** Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular obtidos da avaliação de reversibilidade da desnaturação das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) a temperaturas extremas.

[0030] **Figura 11:** Perfil de bandas obtido da avaliação da estabilidade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) a temperaturas extremas.

[0031] **Figura 12:** Análise gráfica dos índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) a temperaturas extremas.

[0032] **Figura 13:** Análise gráfica dos espectros de dicroísmo circular obtidos da avaliação de estabilidade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) a temperatura ambiente.

[0033] **Figura 14:** Perfil de bandas obtido da avaliação da estabilidade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) a temperatura ambiente.

[0034] **Figura 15:** Análise gráfica dos índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) a temperatura ambiente.

[0035] **Figura 16:** Análise gráfica dos índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) a um período de longa duração.

[0036] **Figura 17:** Análise gráfica dos índices de reatividade de quatro kits comerciais para definição do padrão-ouro.



[0037] **Figura 18:** Análise gráfica dos índices de reatividade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) na fase I do estudo.

[0038] **Figura 19:** Análise gráfica dos índices de reatividade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) na fase II do estudo.

[0039] **Figura 20:** Análise gráfica da comparação dos índices de reatividade de amostras negativas e positivas para as proteínas recombinantes (PRP-IBMP) na fase II do estudo.

[0040] **Figura 21:** Análise gráfica da comparação dos intervalos de confiança a 95% da sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) na fase II do estudo.

[0041] **Figura 22:** Análise gráfica dos índices de reatividade estratificados por região geográfica utilizando as proteínas recombinantes (PRP-IBMP) na fase II do estudo.

[0042] **Figura 23:** Análise gráfica dos índices de reatividade estratificados por região geográfica utilizando as proteínas recombinantes (PRP-IBMP) na fase II do estudo.

[0043] **Figura 24:** Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de doenças infecto-parasitárias.

[0044] **Figura 25:** Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação da reprodutibilidade intraplaca.

[0045] **Figura 26:** Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação da reprodutibilidade entre lotes.

[0046] **Figura 27:** Análise gráfica dos índices de reatividade dos PRP-IBMP na avaliação da reprodutibilidade entre laboratórios.

[0047] **Figura 28:** Comparação dos índices de reatividade entre os PRP-IBMP e kits comerciais.

[0048] **Figura 29:** Classificação dos PRP-IBMP e kits comerciais para Chagas quanto aos parâmetros de desempenho.

[0049] **Figura 30:** Análise gráfica dos índices de reatividade dos testes comerciais com amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias.

[0050] **Figura 31:** Análise gráfica da avaliação das interseções de conjuntos usando os PRP-IBMP usando amostras com resultados inconclusivos.

[0051] **Figura 32:** Níveis de IgG anti-*Trypanosoma cruzi* em amostras de soro de indivíduos com doença de Chagas (Ch) e sem doença de Chagas (não-chagásicos - NCh) avaliados por ELISA.

[0052] **Figura 33:** Níveis de IgG anti-*Trypanosoma cruzi* em amostras de soro de indivíduos com doença de Chagas (Ch) e sem doença de Chagas (não-chagásicos - NCh) avaliados por microarranjo líquido.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[0053] A não ser que sejam definidos de maneira diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado entendido por um técnico no assunto ao qual a invenção pertence. A terminologia utilizada na descrição da invenção tem finalidade de descrever concretizações particulares somente, e não tem a intenção de limitar o escopo dos ensinamentos. A não ser que seja indicado de forma diferente, todos os números expressando quantidades, porcentagens e proporções, e outros valores numéricos usados no relatório descritivo e nas reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados, em todos os casos, pelo termo “cerca de”. Assim, a não ser que seja indicado o contrário, os parâmetros numéricos mostrados no relatório descritivo e nas reivindicações são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades a serem obtidas.

[0054] A prática da presente invenção irá empregar, a menos que indicado de forma diferente, métodos convencionais de química, bioquímica, técnicas de DNA recombinante e imunologia, dentro do conhecimento da técnica. Tais técnicas são explicadas completamente na literatura. Veja, por

exemplo, *Fundamental Virology*, 2ª Edição, vols. I & II (B.N. Fields e D. M. Knipe, eds.); *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir e C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, *Proteins: Structures e Molecular Properties* (W.H. Freeman e Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edição atual); Sambrook, e cols., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edição, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick e N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

[0055] Existe na técnica uma necessidade por métodos diagnósticos que permitam a detecção da doença de Chagas crônica em amostras de teste. Particularmente, existe na técnica uma necessidade por métodos diagnósticos que permitam o diagnóstico de doença de Chagas com alta sensibilidade e sem a ocorrência de reação cruzada, gerando falsos negativos ou falsos positivos. A presente invenção proporciona tais métodos imunodiagnósticos. Particularmente, é provida uma proteína recombinante ou sintética com atividade imunogênica, útil para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença de Chagas. Assim, também estão inclusos no escopo da invenção a sequência de DNA sintético, cassete de expressão, vetor de expressão, célula hospedeira, método de produção da proteína recombinante ou sintética, composição, uso da proteína recombinante ou sintética, kit para diagnóstico da doença de chagas, bem como o método para diagnóstico da doença de chagas.

[0056] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma proteína recombinante ou sintética, que compreende pelo menos um fragmento de uma ou mais proteínas selecionadas do grupo de: fragmento do vetor, antígeno de superfície 2, trans-sialidase, proteína L19 de subunidade ribossomal 60S, calpaína cisteína peptidase, proteína de antígeno repetitivo flagelar, proteína associada ao microtúbulo de *Trypanosoma cruzi*, proteína de membrana citoplasmática, e opcionalmente ligadores ou espaçadores, em

que um ou mais aminoácidos são opcionalmente substituídos, adicionados ou deletados em relação à sequência natural.

[0057] Em um aspecto específico, a dita proteína recombinante ou sintética compreende os fragmentos selecionados do grupo: aminoácidos 1 a 34 do fragmento do vetor (SEQ ID NO: 1), os aminoácidos 288 a 333 do antígeno de superfície 2 (SEQ ID NO: 2), aminoácidos 1000 a 1013 da trans-sialidase (SEQ ID NO: 3), aminoácidos 218 a 234 da proteína L19 de subunidade ribossomal 60S (SEQ ID NO: 4) e aminoácidos 724-743 da trans-sialidase (SEQ ID NO:5).

[0058] Em um aspecto preferencial, a dita proteína recombinante ou sintética é apresentada pela SEQ ID NO: 21 ou uma sequência com 90% de identidade com a SEQ ID NO: 21.

[0059] Em outro aspecto específico, a dita proteína recombinante ou sintética compreende os aminoácidos 1 a 34 do fragmento do vetor da SEQ ID NO: 1, aminoácidos 31 a 97 da calpaína cisteína peptidase (SEQ ID NO: 6), aminoácidos 658 a 669 da trans-sialidase (SEQ ID NO: 7), aminoácidos 283 a 343 da trans-sialidase (SEQ ID NO: 8) e aminoácidos 166 a 231 do antígeno de superfície 2 (SEQ ID NO: 9).

[0060] Em um aspecto preferencial, a dita proteína recombinante ou sintética é apresentada pela SEQ ID NO: 22 ou uma sequência com 90% de identidade com a SEQ ID NO: 22.

[0061] Em um outro aspecto específico, a dita proteína recombinante ou sintética compreende os aminoácidos 566 a 602 do antígeno de superfície 2 (SEQ ID NO: 10), os aminoácidos 2 a 44 da proteína de antígeno repetitivo flagelar (SEQ ID NO: 11), aminoácidos 507 a 551 da trans-sialidase (SEQ ID NO: 12), aminoácidos 236-284 da proteína L19 de subunidade ribossomal 60S (SEQ ID NO: 13) e aminoácidos 1 a 17 do fragmento do vetor (SEQ ID NO: 14).

[0062] Em um aspecto preferencial, a dita proteína recombinante ou

sintética é apresentada pela SEQ ID NO: 23 ou uma sequência com 90% de identidade com a SEQ ID NO: 23.

[0063] Em ainda outro aspecto específico, a dita proteína recombinante ou sintética compreende os aminoácidos 288 a 334 do antígeno de superfície 2 (SEQ ID NO: 2), os aminoácidos 776 a 809 da trans-sialidase (SEQ ID NO: 15), aminoácidos 724 a 743 da trans-sialidase (SEQ ID NO: 16), aminoácidos 682 a 705 da trans-sialidase (SEQ ID NO: 17), aminoácidos 19 a 47 da proteína de antígeno repetitivo flagelar (SEQ ID NO: 11), os aminoácidos 349 a 386 da proteína associada ao microtúbulo (SEQ ID NO: 18), aminoácidos 74 a 92 da proteína de membrana citoplasmática (SEQ ID NO: 19), aminoácidos 1 a 68 da proteína de antígeno repetitivo flagelar (SEQ ID NO: 20) e aminoácidos 1 a 18 da fragmento do vetor (SEQ ID NO: 14).

[0064] Em um aspecto preferencial, a dita proteína recombinante ou sintética é apresentada pela SEQ ID NO: 24 ou uma sequência com 90% de identidade com a SEQ ID NO: 24.

[0065] No presente pedido, os termos “peptídeo”, “polipeptídeo” ou “proteína” podem ser utilizados intercambiavelmente, e fazem referência a um polímero de aminoácidos conectado por ligações peptídicas, independentemente do número de resíduos de aminoácido que constituem esta cadeia. Os polipeptídeos, como aqui usados, incluem “variantes” ou “derivados” dos mesmos, que se referem a um polipeptídeo que inclui variações ou modificações, por exemplo, substituição, deleção, adição ou modificações químicas em sua sequência de aminoácido em relação ao polipeptídeo de referência. Exemplos de modificações químicas são glicosilação, PEGilação, PEG alquilação, alquilação, fosforilação, acetilação, amidação, etc. O polipeptídeo pode ser produzido artificialmente a partir de sequências nucleotídicas clonadas através da técnica de DNA recombinante (“polipeptídeo recombinante”) ou pode ser preparado através de uma reação de síntese química conhecida (“polipeptídeo sintético”).

[0066] Mais especificamente, o termo proteína recombinante ou sintética da presente invenção pode também ser entendido como poliantígeno, antígeno multi-epítopo ou proteína quimérica.

[0067] A atividade imunogênica refere-se à capacidade que uma substância tem de induzir uma resposta imunológica.

[0068] O termo “aminoácido” denota o grupo  $\alpha$ -aminoácidos que diretamente ou na forma de um precursor pode ser codificado por uma sequência de DNA sintético. Os aminoácidos individuais são codificados por ácidos nucleicos consistindo de três nucleotídeos, conhecidos como códons ou terno de bases. Cada aminoácido é codificado por pelo menos um códon. O fato do mesmo aminoácido ser codificado por diferentes códons é conhecido como “degeneração do código genético”. O termo “aminoácido”, como usado no presente pedido, denota os  $\alpha$ -aminoácidos que ocorrem naturalmente, compreendendo alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, e valina.

[0069] O termo “códon” denota um oligonucleotídeo consistindo de três nucleotídeos que codifica um aminoácido definido. Devido à degeneração do código genético, a maioria dos aminoácidos é codificada por mais de um códon. Estes diferentes códons que codificam o mesmo aminoácido têm diferentes frequências relativas de uso nos diferentes organismos. Portanto, um aminoácido específico é codificado tanto por um códon exato ou por um grupo de diferentes códons. Da mesma forma, a sequência de aminoácidos de uma proteína pode ser codificada por diferentes ácidos nucleicos. Portanto, um aminoácido específico (resíduo) em uma proteína pode ser codificado por um grupo de diferentes códons, cada um destes códons tendo uma frequência de uso dentro de uma determinada célula ou organismo.

[0070] O termo “identidade” é definido como o grau de igualdade entre sequências de DNA ou de aminoácidos quando comparados nucleotídeo

por nucleotídeo ou aminoácido por aminoácido com uma sequência de referência.

[0071] O termo “porcentagem de identidade de sequências” refere-se a comparações entre polinucleotídeos ou polipeptídeos e é determinado por duas sequências idealmente alinhadas, sob determinados parâmetros de comparação. Este alinhamento pode compreender *gaps* (espaços), gerando intervalos quando comparadas à sequência de referência, que facilitam uma comparação adequada das mesmas. De maneira geral, o cálculo da porcentagem de identidade considera o número de posições onde o mesmo nucleotídeo ou aminoácido ocorre nas sequências comparadas à sequência referência, sendo realizado através de diversos algoritmos de comparação de sequências e programas conhecidos no estado da arte. Tais algoritmos e programas incluem, mas não são limitados a TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, CLUSTALW, FASTDB.

[0072] A presente invenção também provê antígenos purificados. Os antígenos da presente invenção podem ser purificados por qualquer método conhecido na arte. Preferencialmente, podem ser utilizados métodos de cromatografia. Em certas modalidades pode-se utilizar um cromatógrafo semi-automatizado. Exemplos não limitativos incluem o método de afinidade, troca iônica, fase reversa e exclusão molecular. Pode-se utilizar qualquer coluna conhecida na técnica adequada à purificação de polipeptídeos. Em certas modalidades da presente invenção pode ser empregada uma coluna cromatográfica de afinidade carregada com íons metais tais como Cu(II), Zn(II), Ni(II), Ca(II), Co(II), Mg(II), Fe(III), Al(III) entre outros, ou com moléculas com bioafinidade como imunoglobulinas, heparina, ácidos nucleicos, enzimas ou outro substrato ou ligante específico para uma parte da sequência de aminoácidos dos antígenos, uma coluna de troca iônica carregada com grupamentos funcionais tais como carboxilatos e sulfonatos, que podem ser trocados livremente com íons em solução, e uma coluna de

fase reversa que em alguns casos pode ser funcionalizada por ligantes formados por cadeias de carbono. Os grupamentos funcionais destas colunas estão ligados a uma fase sólida que pode ser composta, de forma não restritiva, por polímeros de polissacarídeos (agarose ou celulose) ou outras matrizes como sílica, dextran, estireno polimerizado, poliacrilamida, e derivados dos referidos materiais. Ainda pode ser empregada uma citada coluna de exclusão molecular que pode ter uma fase sólida composta por uma matriz constituída por partículas esférica que variam de 5 a 100 µm de diâmetro, tendo como propriedade uma reduzida ou ausente reatividade ou capacidade de adsorção. Ditas esferas devem conter poros com tamanhos que variem de 0,22 a 1 µm.

[0073] Os tampões de purificação utilizados podem ser aqueles conhecidos na técnica. Em modalidades particulares, podem ser compostos por reagentes como Tris, CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico), PBS (tampão de salina fosfatada), CABS (ácido 4-(Ciclohexilamino)-1-butanosulfônico), ACES (ácido N-(2-Acetamido)-2-aminoetanosulfônico), ADA (ácido N-(2-Acetamido)iminodiacético), BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), AMPD (2-Amino-2-Metil-1,3-Propanodiol; amediol), HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico), EPPS (ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfônico), TAPS (N-[tris(hidroxietil)metil]-3-aminopropanosulfônico), MOPS (3-morfolinopropano-1-sulfônico), PIPES (ácido 1,4-Piperazinediethanesulfonic, TES (N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfônico), podendo ainda conter sais, ácidos ou bases de fosfato, carbonato, citrato, acetato e succinato, ácido hidrolórico, ácido orto-fosfórico e bicarbonato, , Para resultar em eficiência podem variar em concentrações de 20 a 250 mM. Os tampões de eluição que requeiram mudança de condutividade para recuperação dos polipeptídeos poderão conter sais como



KCl, NaCl ou imidazol. Os fragmentos antigênicos que compõem as proteínas da presente invenção podem ser obtidos de forma recombinante ou sintética. Em uma modalidade particular, as proteínas recombinantes da presente invenção são obtidas por meio de um sistema de expressão, o qual permite a obtenção das proteínas da presente invenção.

[0074] Por sistema de expressão, entende-se um sistema compreendendo as sequências nucleotídicas, as quais são capazes de codificar proteínas associado a um organismo vivo.

[0075] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê sequência de DNA sintético que codificam as proteínas recombinantes ou sintéticas aqui descritas.

[0076] As sequências de DNA sintético de acordo com a invenção são representadas, de forma não limitativa, pelas SEQ ID NO:25-28, e suas degenerações, ou sequências com 90% de identidade com as SEQ ID NO:25-28. As sequências de DNA sintético das SEQ ID NO:25-28 codificam as proteínas recombinantes ou sintéticas representadas pelas SEQ ID NO: 21-24, respectivamente.

[0077] Os termos “sequência de DNA sintético” e “polinucleotídeo” são usados de forma intercambiável, e referem-se a DNA. Os polinucleotídeos podem ser simples ou dupla fita. Exemplos não limitantes de polinucleotídeos incluem genes, fragmentos de genes, éxons, íntrons, DNA complementar, DNA genômico, DNA sintético, DNA recombinante, cassetes, vetores, sondas e iniciadores. O termo “DNA recombinante” refere-se a qualquer sequência nucleotídica artificial que resulta da combinação de sequências de DNA de diferentes origens.

[0078] O termo “sequência de nucleotídeos degenerada” denota uma sequência de nucleotídeos que inclui um ou mais códons degenerados quando comparada com uma molécula de ácido nucleico de referência que codifica um dado polipeptídeo. Códons degenerados contêm diferentes tripletes de

nucleotídeos, mas codificam o mesmo resíduo de aminoácido (p.ex., GAU e GAC ambos codificam Asp).

[0079] Um técnico no assunto reconheceria que as degenerações são integralmente suportadas com base nas informações fornecidas no pedido e no conhecimento comum do estado da técnica. Por exemplo, a degeneração do código genético (isto é, diferentes códons podendo codificar os mesmos aminoácidos) é um conhecimento comum na técnica e a identidade do aminoácido codificado por cada códon é bem estabelecida.

[0080] Com base nas informações bem conhecidas e estabelecidas no estado da técnica, o técnico no assunto é capaz de identificar as substituições de nucleotídeos que não alteram a sequência de aminoácidos resultante. Assim, quando em posse tanto da sequência de nucleotídeos de um gene quanto da sequência de aminoácidos da proteína codificada, o técnico no assunto identificará facilmente as degenerações que codificam a mesma proteína, com a mesma sequência de aminoácidos.

[0081] Em um aspecto preferencial, as sequências de DNA sintético da presente invenção tiveram os códons otimizados.

[0082] Em um aspecto ainda mais preferencial, as sequências de DNA sintético da presente invenção tiveram os códons otimizados para expressão em procariotos.

[0083] Em um aspecto particular, as sequências de DNA sintético da invenção são otimizadas para uso de códon para *Escherichia coli*.

[0084] As sequências nucleotídicas podem estar inseridas em cassetes de expressão, os quais são colocados em condições que conduzam à expressão da proteína correspondente.

[0085] Em um terceiro aspecto, a presente invenção provê um cassete de expressão compreendendo uma sequência de DNA sintético de acordo com a invenção.

[0086] O cassete de expressão pode compreender, ainda, sequências

necessárias a sua expressão, tais como, promotores, sequências intensificadoras e terminadoras compatíveis com o sistema de expressão. Ademais, o cassete de expressão pode compreender sequências espaçadoras, sequências ligadoras e sítios de restrição adequados. Além disso, o cassete pode compreender, ainda, uma sequência codificante para cauda de histidina.

[0087] Em um quarto aspecto da presente invenção, a presente invenção provê um vetor de expressão compreendendo uma sequência de DNA sintético ou um cassete de expressão de acordo com a invenção. Este vetor de expressão pode ser utilizado para transformar uma célula hospedeira e permitir a expressão da sequência de DNA sintético de acordo com a invenção na referida célula.

[0088] Com vantagem, o vetor de expressão compreende elementos reguladores que permitem a expressão da sequência de DNA sintético e elementos que permitem a sua seleção na célula hospedeira de acordo com a invenção. Os métodos para selecionar estes elementos em função da célula hospedeira na qual a expressão é desejada, são bem conhecidos do versado na técnica e amplamente descritos na literatura.

[0089] Os vetores podem ser construídos por técnicas clássicas de biologia molecular, bem conhecidas do versado na técnica. Exemplos não limitantes de vetores de expressão adequados para expressão em células hospedeiras são plasmídeos e vetores virais ou bacterianos.

[0090] Em um quinto aspecto, a presente invenção provê uma célula hospedeira transformada/transfectada de maneira transitória ou estável com o a sequência de DNA sintético, o cassete ou o vetor da invenção. A sequência de DNA sintético, o cassete ou o vetor pode estar contido na célula sob a forma de epissoma ou sob forma cromossômica.

[0091] A célula hospedeira pode ser uma célula de bactéria, levedura, fungos filamentosos, protozoários, insetos, células animais e vegetais.

[0092] Em um aspecto específico, a célula hospedeira é uma célula

bacteriana, preferivelmente uma célula de *Escherichia coli*.

[0093] Em um sexto aspecto, a presente invenção provê método para produzir a proteína recombinante ou sintética de acordo com a invenção, compreendendo a inserção de uma sequência de DNA sintético, um cassete ou um vetor de expressão de acordo com a invenção em um sistema de expressão *in vivo* e a coleta da proteína recombinante ou sintética produzida pelo referido sistema. Numerosos sistemas de expressão *in vivo*, compreendendo o uso de células hospedeiras adequadas, estão disponíveis no comércio e a utilização destes sistemas é bem conhecida do versado na técnica.

[0094] Sistemas de expressão particularmente adequados incluem microrganismos, como bactérias transformadas com vetores de expressão de DNA recombinante de bacteriófago, plasmídeo ou cosmídeo; levedura transformada com vetores de expressão de levedura; sistemas de células de insetos infectadas com vetores de expressão de vírus (por exemplo, baculovírus); sistemas de células de plantas transformados com vetores de expressão de vírus (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV [*cauliflower mosaic virus*]; vírus do mosaico do tabaco, TMV [*tobacco mosaic virus*]) ou com vetores de expressão bacterianos (por exemplo, plasmídeos Ti ou pBR322); ou sistemas de células animais. Também é possível empregar sistemas de tradução isentos de células para produzir os polipeptídeos da invenção.

[0095] A sequência de DNA sintético, cassete de expressão ou o vetor é inserido em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas competentes. Os clones recombinantes são selecionados e então, submetidos à análise por enzimas de restrição e sequenciamento de DNA, possibilitando a confirmação da sequência clonada, utilizando-se para isso métodos, kits e equipamentos amplamente conhecidos por um técnico no assunto.

[0096] Assim, as sequências de DNA sintético da invenção podem ser preparadas usando tecnologia de DNA recombinante, em que um cassete ou

vetor de expressão compreendendo uma sequência de polinucleotídeo da invenção, por exemplo, que codifica qualquer uma das proteínas recombinantes ou sintéticas dos polipeptídeos de SEQ ID Nos: 21 a 24, é operacionalmente ligada a um promotor.

[0097] A introdução da sequência de DNA sintético, cassete de expressão ou o vetor que codifica uma proteína recombinante ou sintética da presente invenção em células hospedeiras pode ser realizada por meio de métodos descritos em muitos manuais de laboratório padrão, como Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) e Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989).

[0098] A célula hospedeira transformada ou transfectada descrita acima é depois cultivada em um meio nutriente adequado sob condições conducentes que permitam a expressão das proteínas recombinantes da invenção. O meio usado para cultivar as células pode ser qualquer meio convencional adequado para desenvolver as células hospedeiras, tal como meio mínimo ou complexo contendo suplementos apropriados. Os meios adequados estão disponíveis a partir de fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com receitas publicadas (por exemplo, nos catálogos da American Type Culture Collection). As proteínas da invenção produzidos pelas células podem ser depois recuperados da célula ou do meio de cultura por procedimentos convencionais incluindo separar as células hospedeiras do meio pela centrifugação ou filtração, precipitando os componentes aquosos de proteína do sobrenadante ou filtrado por meio de um sal, por exemplo, sulfato de amônio, tratamento térmico, mudança de pH, purificação por uma variedade de procedimentos cromatográficos, por exemplo cromatografia por troca iônica, cromatografia por exclusão, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia por filtração em gel, cromatografia por afinidade ou similares, dependente do tipo de polipeptídeo em questão.

[0099] O polipeptídeo recombinante obtido é analisado e tratado de

modo a solubilizá-lo, quando pertinente. O polipeptídeo solubilizado é, então, purificado e caracterizado bioquimicamente, utilizando-se, por exemplo, métodos comuns ao campo da bioquímica, como HPLC, SDS-PAGE, *Western Blotting*, focalização isoeétrica com gradiente de pH, dicroísmo circular, espalhamento dinâmico de luz. Por meio desses métodos, é possível determinar características como, por exemplo, o rendimento da expressão do polipeptídeo recombinante; a pureza, a determinação das características das estruturas secundárias, o grau de polidispersividade, além de outras características cuja determinação é importante para o desenvolvimento de uma composição para uso como reagente para diagnóstico de doença de Chagas.

[00100] Os polipeptídeos podem ser expressos “fusionados” a uma etiqueta. O termo “etiqueta” ou o termo em inglês “tag” refere-se a sequências codificadoras incorporadas próximas ao sítio múltiplo de clonagem de um vetor de expressão, possibilitando a sua tradução concomitante e adjacente à sequência do polipeptídeo recombinante clonada. Assim, a etiqueta é expressa fusionada ao polipeptídeo recombinante. Tais etiquetas são bem conhecidas no estado da técnica e incluem compostos e peptídeos como poli-histidina, poli-arginina, FLAG, glutationa-S-transferase, proteína ligante a maltose (MBP), domínio ligante a celulose (CBD), Beta-Gal, OMNI, tioredoxina, NusA, mistina, domínio ligante a quitina, cutinase, compostos fluorescentes (como GFP, YFP, FITC, rodamina, lantanídeos), enzimas (como peroxidase, luciferase, fosfatase alcalina), compostos quimioluminescentes, grupos biotinila, epítomos reconhecidos por anticorpos como zíper de leucina, c-myc, domínios ligantes a metais e sítios de ligação para anticorpos secundários.

[00101] Os polipeptídeos também podem ser obtidos sinteticamente usando métodos conhecidos na arte. Síntese direta dos polipeptídeos da invenção pode ser realizada usando síntese em fase sólida, síntese em solução ou outros meios convencionais, utilizando geralmente grupos de proteção do

$\alpha$ -aminogrupos, da  $\alpha$ -carboxila e/ou dos grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos. Por exemplo, na síntese em fase sólida, um resíduo de aminoácido adequadamente protegido é ligado através do seu grupo carboxila a um suporte polimérico insolúvel, tais como uma resina reticulada de poliestireno ou poliamida. Métodos de síntese em fase sólida incluem tanto métodos BOC e FMOC, que utilizam tert-butiloxicarbonil, e 9-fluorenilmetiloxicarbonila como grupos protetores  $\alpha$ -amino, respectivamente, ambos bem conhecidos pelos técnicos no assunto (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1995).

[00102] Os seguintes grupos protetores podem ser exemplos utilizados para a síntese dos polipeptídeos da invenção: 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc), tert-butiloxicarbonil (Boc), carbobenziloxi (Cbz), 2-cloro-3-indenilmetoxicarbonil (Clmoc), benz(f)indeno-3-il-metóxicarbonil (Bimoc), 1,1-dioxobenzo[b]tiofeno-2-il-metoxicarbonil (Bsmoc), 2,2,2-tricloroetóxicarbonil (Troc), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonil (Teoc), homobenziloxicarbonil (hZ), 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetóxicarbonil (TCBoc), 1-metil-1-(4-bifenil)etoxicarbonil (Bpoc), 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletoxicarbonil (t-Bumeoc), 2-(2'- or 4'-piridil)etoxicarbonil (Pyoc), viniloxicarbonil (Voc), 1-isopropilaliloxicarbonil (Ipaoc), 3-(piridil)aliloxicarbonil (Paloc), p-metoxibenziloxicarbonil (Moz), p-nitrocarbamato (PNZ), 4-azidobenziloxycarbonyl (AZBZ), Benzil (Bn) MeO, BnO, Metoximetil (Mom), metiltiometil (MTM), fenildimetilsililmetoximetil (SMOM), t-butildimetilsilil (TBDMS), benziloximetil (BOM), p-metoxibenziloximetil (PMBM), nitrobenziloximetil (NBOM), p-anisiloximetil (p-AOM), pBuOCH<sub>2</sub>O-, 4-penteniloximetil (POM), 2-metoxietóximetil (MEM), 2-(trimetilsilil)etoximetil (SEM), mentoximetil (MM), tetraidropiranil (THP), -OCOCOPh, Acetil, ClCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-, -

CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>, 2-(Trimetilsilil)etil (TMSE), 2(p-toluenosulfonil)etil (Tse). (Greene T.W. Wuts P.G.M., Protective groups in organic synthesis, 3rd ed., John Wiley & Sons, INC, Nova York, EUA, 1999).

[00103] Após a reação química, os polipeptídeos podem ser separados e purificados por um método de purificação conhecido. Um exemplo de tais métodos de purificação pode incluir uma combinação de extração por solvente, destilação, cromatografia por coluna, cromatografia líquida, recristalização e similares.

[00104] De acordo com o sexto aspecto da invenção, é fornecido um método para produzir uma proteína recombinante ou sintética de acordo com a invenção, compreendendo:

(a) transferir para uma célula hospedeira um polinucleotídeo da presente invenção para obter uma célula hospedeira transformada ou transfectada;

(b) cultivar a célula hospedeira transformada ou transfectada para obter uma cultura de células;

(c) expressar o polinucleotídeo da presente invenção em uma célula hospedeira transformada ou transfectada para produzir um polipeptídeo; e

(e) isolar o polipeptídeo da presente invenção da célula ou da cultura de célula.

[00105] Em um sétimo aspecto, a invenção provê uma composição, compreendendo uma ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas da invenção.

[00106] Em um aspecto particular, a composição é utilizada como reagente para um método para diagnóstico de doença de Chagas.

[00107] Adicionalmente, são providas composições estabilizadas dos antígenos da presente invenção. As composições estabilizadas da presente invenção resultam na ausência de agregados proteicos, o que garante a não



interferência na interação antígeno-anticorpo, relacionada à agregação, nos imunoenaios da presente invenção.

[00108] Em um aspecto particular da presente invenção, são providas formulações de tampões de armazenamento para purificação e estabilização dos antígenos da invenção. Os tampões utilizados na presente invenção são conhecidos na arte. Em modalidades específicas podem ser utilizados os tampões Tris-HCl, Tris, CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico), PBS (tampão de salina fosfatada), CABS (ácido 4-(Ciclohexilamino)-1-butanosulfônico), ACES (ácido N-(2-Acetamido)-2-aminoetanosulfônico), ADA (ácido N-(2-Acetamido)iminodiacético), BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxi-2-etil)-2-aminoetanosulfônico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), AMPD (2-Amino-2-Metil-1,3-Propanodiol; amediol), HEPES (4-(2-hidroxi-2-etil)-1-piperazinaetanosulfônico), EPPS (ácido 3-[4-(2-hidroxi-2-etil)-1-piperazinil]propanosulfônico), TAPS (N-[tris(hidroxi-2-etil)metil]-3-aminopropanosulfônico), MOPS (3-morfolinopropano-1-sulfônico), PIPES (ácido 1,4-Piperazinedietanesulfônico), TES (N-[tris(hidroxi-2-etil)metil]-2-aminoetanosulfônico), rol, e bicarbonato. Os detergentes glicosídicos; detergentes de poli(oxietileno), como família Tween20 a 80, Nonidet-P-40; polímeros de etilenoglicóeter, como Triton X-100 e X-114, e IGEPAL; detergentes de sulfatos de alquil e sais de dodecilsulfatos, como SDS (dodecil sulfato de sódio); detergentes de alquil sulfonatos, sal de docusato de sódio, brometo de alquiltrimetilamônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, hidróxido de benzetônio, brometo de dimetildioctadecilamônio, brometo de dodeciltrimetilamônio, monohidrato de cloreto de hexadecilpiridínio, brometo de hexadeciltrimetilamônio, cloreto de metilbenzetônio, brometo de miristiltrimetilamônio, ASB-14, C7zBO, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, DDAO, SB3-14, SB3-18, SB3-8, sulfobetaínas, derivados de ciclodextrinas. Esses reagentes serão efetivos sozinhos ou em

combinação com sais como NaCl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . As formulações poderão conter inibidores de proteases podendo ser empregado mas não restrito a combinações de inibidores de proteases específicos para *Escherichia coli*, comercialmente disponíveis como coquetéis de diversos fabricantes ou combinações de inibidores de serina proteases, cisteína proteases, tripsina, quimiotripsina, e plasmina, como AEBSF, Bestatin, Pepstatin A, E-64, entre outros adequados ao microrganismo citado.

[00109] Em outro aspecto particular da presente invenção, são providos aditivos para as formulações de tampões de armazenamento. Os aditivos utilizados na presente invenção são conhecidos na arte. Em modalidades específicas podem ser utilizados aditivos e crioprotetores como glicerol, acetamida, sucrose, trealose, lactose, glicose, sacarose, DMSO (dimetilsufóxido), etilenoglicol, propilenoglicol, MPD (2-metil-2,4-pentanediol), derivados de formamida; detergentes como DDM (dodecil  $\beta$ -D-maltoside), OGP (octil  $\beta$ -D-glucoside); detergentes de sais biliares, como deoxicolato, colato, glicolato, taurideoxicolato, sal de ácido taurocólico; ácido deoxicólico, ácido cólico, ácido taurideoxicólico, ácido glicólico, sarcosil, n-laurilsarcosina, CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio), TTAB (brometo de tetradeciltrimetilamônio), hiamina, N,N-Bis[3-(D-gluconamido)propil]deoxicolamida, digitonina, saponina, N-Decanoil-N-metilglucamina, óxido de dimetildecilfosfina, óxido de dodecildimetilfosfina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-octanoil-N-metilglucamina, span, tiloxapol; detergentes glicosídicos; detergentes de poli(oxietileno), como família Tween20 a 80, Nonidet-P-40; polímeros de etilenoglicóéter, como Triton X-100 e X-114, e IGEPAL; detergentes de sulfatos de alquil e sais de dodecilsulfatos, como SDS (dodecil sulfato de sódio); detergentes de alquil sulfonatos, sal de docusato de sódio, brometo de alquiltrimetilamônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, hidróxido de benzetônio, brometo de dimetildioctadecilamônio, brometo de dodeciltrimetilamônio, monohidrato de

cloreto de hexadecilpiridínio, brometo de hexadeciltrimetilamônio, cloreto de metilbenzetônio, brometo de miristiltrimetilamônio, ASB-14, C7zBO, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, DDAO, SB3-14, SB3-18, SB3-8, sulfobetaínas, derivados de ciclodextrinas; diversos sais como NaCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O; desnaturantes como, ureia, tiourea, guanidina, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido salicílico, ácido sulfosalicílico, bicarbonato de sódio; redutores como DTT (ditiotreitól), DTE (ditioeritritól), 2-mercaptoetanol, cisteína, cloreto estanoso (SnCl<sub>2</sub>), ácido ascórbico (AA), iodoacetamida, cloroacetamida, tributilfosfina, hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina. TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina), e TBTA (1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina).

[00110] Em modalidades específicas da invenção foram também determinadas as concentrações não agregantes de antígeno. Deste modo, as concentrações dos antígenos da presente invenção na composição variam, de um modo geral, de 0,01 a 10 mg/mL, preferencialmente, de 1,0 a 8 mg/mL.

[00111] Em um oitavo aspecto, a invenção provê o uso da proteína recombinante ou sintética da invenção ou de uma composição como aqui descrita para a manufatura de um reagente para diagnóstico de doença de Chagas.

[00112] Em um aspecto particular da invenção, o reagente é para ser utilizado em kits para o diagnóstico de doença de Chagas.

[00113] Em outro aspecto particular, o reagente é para uso em um método para a diagnóstico de doença de Chagas em uma amostra biológica.

[00114] De acordo a invenção, as amostras podem ser amostras de sangue total, soro, plasma, urina, saliva, ou outros fluidos biológicos suspeitos de conterem IgG para *Trypanosoma cruzi*.

[00115] O nono aspecto da invenção provê kit para o imunodiagnóstico de doença de Chagas. O kit compreende uma ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas ou uma composição compreendendo uma ou mais

proteínas recombinantes de acordo com a presente invenção.

[00116] Opcionalmente, o dito kit compreende instruções de uso e controle positivo de reação.

[00117] Preferencialmente, o controle positivo de reação é um anticorpo.

[00118] Adicionalmente, o kit compreende um meio de detecção do complexo antígeno/ anticorpo, o qual pode compreender um gerador de sinal, capaz de gerar um sinal detectável.

[00119] Os meios de detecção podem ser aqueles conhecidos na técnica. Um exemplo não limitativo do meio de detecção pode ser um conjugado compreendido por um anticorpo acoplado a um composto gerador de sinal, capaz de gerar um sinal detectável.

[00120] Em um aspecto preferencial, os kits são desenvolvidos para ensaios imunoenzimáticos (EIE) e microarranjo líquido.

[00121] Em um aspecto ainda mais preferencial, os ensaios imunoenzimáticos (EIE) são ensaios do tipo indireto.

[00122] Em um décimo aspecto, métodos para diagnóstico da Doença de Chagas são também providos pela presente invenção.

[00123] Particularmente, o diagnóstico da doença de Chagas ocorre através da detecção de imunoglobulina anti-*T. cruzi* na fase crônica da referida doença em amostras de indivíduos. Preferencialmente, a imunoglobulina é IgG.

[00124] O método para diagnóstico da Doença de Chagas da presente invenção, inclui, em geral, as seguintes etapas:

(a) prover uma ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas ou uma composição compreendendo uma ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas de acordo com a presente invenção;

(b) contatar a dita uma ou mais proteínas recombinantes ou sintética ou dita composição compreendendo uma ou mais proteínas

recombinantes ou sintéticas com a amostra a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/antígeno;

(c) detectar o complexo antígeno/ anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/ anticorpo.

[00125] A presente invenção será doravante ilustrada por meio de exemplos, os quais não pretendem, de forma alguma, serem limitativos quando ao escopo e a abrangência da presente invenção.

### **Exemplos**

#### Exemplo 1- Obtenção das proteínas recombinantes

[00126] As sequências de aminoácidos de antígenos de *T. cruzi* foram selecionadas da literatura (Houghton et al, 1999, Camussone et al 2009, Hernández et al 2010, Houghton et al 2009) e otimizadas com adição, substituição ou deleção de um ou mais aminoácidos.

[00127] As otimizações efetuadas nas sequências obtidas da literatura descritas a seguir são exemplificadoras e não pretendem ser limitantes quanto ao escopo da presente invenção.

[00128] **Proteína Recombinante IBMP 8-1, representada pela SEQ ID NO: 21:**

[00129] Os aminoácidos 35 a 98 da SEQ ID NO:21 são referentes à sequência obtida do artigo Houghton et al, 1999, em que as cisteínas das posições 58 e 76 foram substituídas por serinas para evitar oligomerização por ligação de grupos tiol.

[00130] Os aminoácidos 1 a 34 da SEQ ID NO: 21 referem-se à região proveniente do vetor pET28, que foram introduzidos na sequência obtida da literatura para expressão da proteína recombinante.

[00131] Os aminoácidos 99 a 128 referem-se à sequência obtida da literatura.

[00132] **Proteína Recombinante IBMP 8-2, representada pela SEQ ID NO: 22:**

[00133] Os aminoácidos 35 a 251 da SEQ ID NO: 22 referem-se à sequência obtida do artigo Hernández et al., 2010, em que o aminoácido treonina da posição 135 da sequência da literatura foi substituído por uma arginina.

[00134] Os aminoácidos 1 a 34 da SEQ ID NO: 22 referem-se à região proveniente do vetor pET28, que foram introduzidos na sequência obtida da literatura para expressão da proteína recombinante.

[00135] **Proteína Recombinante IBMP 8-3, representada pela SEQ ID NO: 23:**

[00136] Os aminoácidos 3 a 197 da SEQ ID NO: 23 referem-se à sequência obtida do artigo Hernández et al., 2010. Esta sequência também está disponível no site NCBI como ADM07453.1 *TcBCDE, partial [synthetic construct]*.

[00137] Os aminoácidos 198 a 214 da SEQ ID NO: 23 referem-se à etiqueta com 6 histidinas proveniente do vetor pET28, que foi introduzida na região C-terminal da sequência obtida da literatura para expressão da proteína recombinante.

[00138] Os aminoácidos das posições 1 e 2 da SEQ ID NO: 23 referem-se a nucleotídeos para corte das enzimas de restrição.

[00139] **Proteína Recombinante IBMP 8-4, representada pela SEQ ID NO: 24:**

[00140] Os aminoácidos 5 a 286 da SEQ ID NO: 24 referem-se à sequência obtida do artigo de Houghton et al. (2009), em que o aminoácido arginina da posição 167 foi substituído por uma prolina e o aminoácido prolina da posição 168 foi substituído por uma arginina.

[00141] Os aminoácidos 290 a 306 da SEQ ID NO: 24 referem-se à região proveniente do vetor pET28, utilizado para expressão da quimera.

[00142] Os aminoácidos das posições 1 a 4 da SEQ ID NO:24 referem-se a nucleotídeos para corte das enzimas de restrição mais um pequeno espaçador para flexibilizar a ação da enzima. Dessa forma, obteve-se quatro proteínas recombinantes denominadas de IBMP 8-1, IBMP 8-2, IBMP 8-3 e IBMP 8-4, descritas em detalhes na tabela abaixo.

[00143] As SEQ ID NO: de cada proteína recombinante, isto é, IBMP 8-1, IBMP 8-2, IBMP 8-3 e IBMP 8-4, bem como as SEQ ID NO: dos antígenos que compõe as referidas proteínas recombinantes também estão representadas na tabela abaixo.

Tabela 1: Proteína recombinante e suas sequências, fragmentos que compõe cada proteína recombinante e sequência de DNA sintético que codifica cada proteína recombinante.

Proteínas Recombinantes	Nome da Sequência no GenBank	No. de Acesso	Posição dos Aminácidos	SEQ ID NO:
	Fragmento do vetor pET28		1-34	1
IBMP-8.1	Surface antigen 2 (CA-2) - <i>T. cruzi</i> strain CL Brener	XP_813516.1	288-333	2
	Trans-sialidase - <i>T. cruzi</i> strain CL Brener	XP_813586.1	1000-1013	3
	60S ribosomal protein L19 - <i>T. cruzi</i> strain CL Brener	XP_820995.1	218-234	4
	Trans-sialidase - <i>T. cruzi cruzi</i>	PBJ71599.1	724-743	5
	Fragmento do vetor pET28		1-34	1
IBMP-8.2	Calpain cysteine peptidase - <i>T. cruzi</i> strain CL Brener	XP_804989.1	31-97	6
	trans-sialidase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	XP_806228.1	658-669	7
	trans-sialidase, partial [Trypanosoma cruzi strain	XP_802385.1	283-343	8

	CL Brener]			
	Surface antigen 2 (CA-2) - <i>T. cruzi</i> strain CL Brener	XP_818927.1	166-231	9
IBMP-8.3	surface antigen 2 (CA-2) [Trypanosoma cruzi cruzi]	PBJ69634.1	566-602	10
	Flagellar repetitive antigen protein, partial - <i>T. cruzi</i>	AAA30177.1	2-44	11
	trans-sialidase, partial [Trypanosoma cruzi]	ADX23545.1	507-551	12
	60S ribosomal protein L19 - <i>T. cruzi</i> strain CL Brener	XP_808122.1	236-284	13
	Fragmento do vetor pET28		1-17	14
IBMP-8.4	Surface antigen 2 (CA-2) - <i>T. cruzi</i> strain CL Brener	XP_813516.1	288-334	2
	trans-sialidase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	XP_820186.1	776-809	15
	trans-sialidase [Trypanosoma cruzi cruzi]	PBJ71599.1	724-743	16
	trans-sialidase [Trypanosoma cruzi cruzi]	PBJ74496.1	682-705	17
	Flagellar repetitive antigen protein - <i>T. cruzi</i>	AAA30177.1	19-47	11
	microtubule-associated protein, partial [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	XP_803031.1	349-386	18
	kinetoplastid membrane protein KMP-11 [Trypanosoma grayi]	XP_009316503.1	74-92	19
	Flagellar repetitive antigen protein, partial - <i>T. cruzi</i>	AAA30197.1	1-68	20
	Fragmento do vetor pET28		1-18	14
	Proteína recombinante (IBMP-8.1)			21
Proteína recombinante (IBMP-8.2)			22	
Proteína recombinante (IBMP-8.3)			23	
Proteína recombinante (IBMP-8.4)			24	



Sequência de ácido nucleico que codifica a proteína recombinante IBMP 8-1	25
Sequência de ácido nucleico que codifica a proteína recombinante IBMP 8-2	26
Sequência de ácido nucleico que codifica a proteína recombinante IBMP 8-3	27
Sequência de ácido nucleico que codifica a proteína recombinante IBMP 8-4	28

### Exemplo 2- Síntese das sequências de DNA

[00144] A síntese do DNA correspondente a cada proteína recombinante foi solicitada a uma empresa externa (GenScript, EUA). Em laboratório, os genes foram clonados no vetor de expressão pET28a (plasmídeo comercial, Novagen).

[00145] Assim, as proteínas recombinantes IBMP 8-1 a IBMP 8-4 deram origem às sequências de DNA correspondentes, representadas pelas SEQ ID Nos: 25 a 28, respectivamente.

### Exemplo 3- Padronização da produção das proteínas recombinantes

[00146] As proteínas foram expressas em *E.coli* BL21 star (DE)3 e posteriormente foram purificadas por pelo menos duas etapas de cromatografia líquida. Várias condições de expressão e purificação foram testadas e selecionadas de acordo com o rendimento/litro de cultura de células com a maior pureza possível.

[00147] O cultivo de células de *E. coli* foi padronizado igualmente para as 4 moléculas. Resumidamente:

[00148] Tabela 2: Padronização das células *E. coli*

<b>Materiais</b>	<b>Valores</b>
Célula	<i>E. coli</i> BL21 STAR (DE3) quimicamente competente

Plasmídeo	pET28a
Meio de cultivo LB com canamicina (50 µg/mL)	Lennox, E. S. (1955)
IPTG	Concent. Final 0,5 mM

[00149] Inoculou-se uma colônia da bactéria transformada com o plasmídeo em 220 mL de LB + 50 µg/mL canamicina. Incubou-se a 37°C, 200 RPM, 16 horas. Com 25 mL desta pré-cultura inoculou-se 475 mL de LB + 50 µg/mL canamicina. Os frascos foram encubados a 37°C e 200 RPM até atingir D.O. 600 próxima de 0,8 (cerca de 1h e 45min). A indução da expressão das proteínas ocorreu por adição de IPTG para a concentração final de 0,5 mM e a seguir os frascos foram mantidos a 37°C e 200 RPM por 4 horas. As células foram coletadas por centrifugação (10 min a 8.000 rpm), pesou-se a massa úmida de células e congelou-se o pellet a -20°C ou -80°C até a lise e preparo do extrato de proteínas totais para purificação.

[00150] As células foram descongeladas e resuspendidas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 0,3 mM NaCl, 1mM PMSF). O material foi centrifugado 20 min a 20.000 x rpm a 4°C. O sobrenadante foi injetado no cromatógrafo e purificado com pequenas diferenças específicas para cada proteína como a seguir:

[00151] Proteína IBMP 8-1: Tampões de cromatografia de afinidade em coluna de níquel: A= 20 mM Fosfato de Na, 300mM NaCl, 5 mM imidazol, 1mM PMSF, pH7.5. Tampão B= idem ao A, porém com 1,5M de imidazol. Gradiente conforme a tabela:

[00152] Tabela 3: Gradientes da cromatografia:

<b>Etapa</b>	<b>Valor</b>
Lavagens do não ligado	2 a 15 CV
Fluxo de injeção de amostra	1 mL/min

Fluxo de eluição	1 mL/min
Concentração alvo de B	1,5 M
Concentração alvo de B	100%
Volumes de coluna	15 CV

[00153] As melhores frações foram selecionadas para serem melhor purificadas na segunda cromatografia que é uma troca iônica em resina SP Tampão A=20 Mm Fosfato de Sódio, 20 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH6.5 Tampão B=idem ao A, porém com 1,5 M NaCl. O gradiente desta cromatografia é como a seguir:

[00154] Tabela 4: Gradientes da cromatografia:

<b>Etapa</b>	<b>Valor</b>
Lavagens não ligado	2 a 10 CV
Fluxo de injeção de amostra	1 mL/min
Fluxo de eluição	1 mL/min
Concentração alvo de B	100%
Volumes de coluna	10 a 15

[00155] Proteína IBMP 8-2: Tampões de cromatografia de afinidade em coluna de níquel: A=50mM Tris HCl, 300mM NaCl, 5mM imidazol, pH 8, 0.5 mM PMSF. Tampão B=idem ao A, porém com 1000 mM imidazol. Gradiente desta cromatografia conforme tabela:

[00156] Tabela 5: Gradientes utilizados para cromatografia:

<b>Etapa</b>	<b>Valor</b>
Lavagens do não ligado	2 a 10 CV
Fluxo de injeção de amostra	1 mL/min
Fluxo de eluição	1 mL/min

Concentração alvo de B	100%
Volumes de coluna	20 CV

[00157] As melhores frações foram selecionadas para serem melhor purificadas na segunda cromatografia que é uma troca iônica em resina SP: Tampão A=20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1mM PMSF, pH8. Tampão B=idem ao A, porém com 1 M NaCl. Gradiente desta cromatografia conforme tabela:

[00158] Tabela 6: Gradientes utilizados para cromatografia:

<b>Etapa</b>	<b>Valor</b>
Lavagens não ligado	2 a 10 CV
Fluxo de injeção de amostra	1 mL/min
Fluxo de eluição	1 mL/min
Segmento da lavagem	1
Concentração alvo de B	100 %
Extensão do gradiente	20 CV

[00159] Proteína IBMP 8-3: Tampões de cromatografia de afinidade em coluna de níquel: Tampão A=20 mM Fosfato Na, 300mM NaCl, 5mM imidazol, 1mM PMSF, pH 7.5. Tampão B=idem ao A, porém com 1000 mM imidazol. Gradiente desta cromatografia conforme tabela:

[00160] Tabela 7: Gradientes utilizados para cromatografia:

<b>Etapa</b>	<b>Valor</b>
Lavagens do não ligado	2 a 15 CV
Fluxo de injeção de amostra	1 mL/min
Fluxo de eluição	1 mL/min
Concentração alvo de B	100 %

Extensão do gradiente	10 CV
-----------------------	-------

[00161] As melhores frações são selecionadas para serem melhor purificadas na segunda cromatografia que é uma troca iônica em resina: Tampão A=0 mM fosfato de Na, 20mM NaCl, 1mM PMSF, pH 6,5. Tampão B=idem ao A, porém com 1 M NaCl. Gradiente desta cromatografia conforme tabela:

[00162] Tabela 8: Gradientes utilizados para cromatografia:

<b>Etapa</b>	<b>Valor</b>
Lavagens não ligado	2 a 10CV
Fluxo de injeção de amostra	1 mL/min
Fluxo de eluição	1 mL/min
Concentração alvo de B	100 %
Extensão do gradiente	20 CV

[00163] Proteína IBMP 8-4: Tampões de cromatografia de afinidade em coluna níquel: Tampão A=50 mM TrisHCl, 260 mM NaCl, 3 mM Imidazol, 1 mM PMSF, pH 8. Tampão B=idem ao A, porém com 500 mM imidazol. Gradiente desta cromatografia conforme tabela:

[00164] Tabela 9: Gradientes utilizados para cromatografia:

<b>Etapa</b>	<b>Valor</b>
Lavagens do não ligado	2 a 10 CV
Fluxo de injeção de amostra	2 mL/min
Fluxo de eluição	1 mL/min
Concentração alvo de B	90 %
Extensão do gradiente	20 CV

[00165] As melhores frações são selecionadas para serem melhor purificadas na segunda cromatografia que é uma troca iônica em resina SP: Tampão A=50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 8. Tampão B=idem ao A, porém com 1 M NaCl. Gradiente desta cromatografia conforme tabela:

[00166] Tabela 10: Gradientes utilizados para cromatografia:

<b>Etapa</b>	<b>Valor</b>
Lavagens não ligado	2 a 10 CV
Fluxo de injeção de amostra	1 mL/min
Fluxo de eluição	1 mL/min
Concentração alvo de B	80 %
Extensão do gradiente	20 CV

#### Exemplo 4 - Determinação da concentração das proteínas recombinantes

[00167] As proteínas recombinantes ou sintéticas IBMP 8-1 a IBMP 8-4 foram quantificadas através de fluorimetria utilizando o equipamento Qubit 2.0 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). As amostras de interesse foram misturadas à solução fornecida pelo fabricante, incubadas por 2 minutos e a fluorescência emitida determinada pelo equipamento.

[00168] Dois lotes das proteínas IBMP foram produzidos e purificados, sendo o lote 1 utilizado para o estudo do potencial diagnóstico e o segundo para caracterização da estrutura secundária em diferentes condições físico-químicas, conforme tabela abaixo:

[00169] Tabela 11: Lotes de produção dos PRP-IBMP

<b>Lotes</b>	<b>PRP-IBMP</b>	<b>Lote de produção</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Finalidade de uso</b>
<b>1</b>	<b>8.1</b>	150613	0,5	<b>Análise do potencial diagnóstico e Ensaio de Reprodutibilidade</b>
	<b>8.2</b>	270613	0,7	
	<b>8.3</b>	020913	1,0	
	<b>8.4</b>	080813	1,8	
<b>2</b>	<b>8.1</b>	180613	1,3	<b>Caracterização da estrutura secundária e Ensaio de Reprodutibilidade</b>
	<b>8.2</b>	180613	2,0	
	<b>8.3</b>	291013	3,0	
	<b>8.4</b>	090813	4,2	

### Exemplo 5- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

[00170] A pureza e a integridade das proteínas recombinantes foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito a seguir:

[00171] Alíquotas dos PRP-IBMP (1 µg/poço) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970). Os géis de concentração (*stacking gel*) e de separação (*running gel*) foram preparados a uma concentração de acrilamida de 4,5% e 13%, respectivamente. As proteínas recombinantes IBMP 8-1 a IBMP 8-4 foram avaliados submetendo o gel à coloração pelo Coomassie Blue R250 (Bio-Rad). Como marcador de peso molecular foi utilizado o Kaleidoscope™ Prestained Standards (BioRad).

[00172] A análise eletroforética das proteínas IBMP mostrou presença de bandas intensas e bem conservadas para as quatro moléculas, com exceção para a pequena degradação observada na proteína IBMP 8-4. O resultado das purificações é demonstrado na Figura 1.

### Exemplo 6 - Determinação do Potencial Diagnóstico

[00173] Foram empregadas a técnica de ELISA e de microarranjo líquido (material da marca Luminex®) usando um painel de soros humanos não comercial e bastante heterogêneo, oriundo de vários Hemocentros e Instituições públicas do Brasil.

#### **ELISA:**

### Exemplo 7 - Padronização do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA indireto)

#### Seleção do sistema-tampão para sensibilização das microplacas:

[00174] As proteínas recombinantes IBMP 8-1 a IBMP 8-4 foram submetidas a diferentes condições de pH e força iônica visando obter informações sobre o conteúdo de estrutura secundária e estado de

oligomerização. Para esta finalidade foram utilizadas as metodologias de dicroísmo circular (DC) e espalhamento dinâmico da luz (EDL) quando as proteínas recombinantes IBMP 8-1 a IBMP 8-4 encontravam-se nos sistemas-tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6), fosfato de sódio (50 mM pH 7,5) e ácido 2-N-morfolinoetanosulfônico (MES; 50 mM pH 5,5). Os espectros de CD para as proteínas recombinantes foram determinados no espectropolarímetro JASCO J-815 (Hachioji, Tokio, Japão), equipado com um controlador de temperatura acoplado a um banho de água circulante, denominado *Peltier type CD/FL cell* (Jasco, Tokio, Japão). Foram utilizadas cubetas retangulares de quartzo de 1 mm de caminho óptico. O espectropolarímetro foi programado para gerar médias espectrais a partir de quatro aquisições e, em cada uma delas, mediu-se a elipicidade em graus na região do UV, no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 190 nm, com uma velocidade de 100 nm/min. O estado de agregação e oligomerização das proteínas IBMP 8-1 a IBMP 8-4 foram avaliados através do EDL. O coeficiente de difusão foi determinado a partir da taxa de decaimento de intensidade e foi utilizado para calcular o raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) da proteína através da equação de Stokes-Einsteis ( $DT = KBT (6\pi\eta R_h)^{-1}$ ). A aquisição dos dados foi realizada no equipamento *Dynamic Light Scattering DynaPro NanoStar* (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara-CA, EUA) e a sua análise no programa Dynamics 7.1.7.16.

[00175] Os resultados do EDL e os espectros de DC, obtidos quando as proteínas recombinantes se encontravam nos sistemas-tampão carbonato de sódio (50 mM, pH 9,6), fosfato de sódio (50 mM, pH 7,5) e MES (50 mM, pH 5,5), encontram-se descritos na Tabela 12 e na Figura 2, respectivamente.

[00176] Tabela 12: Análise do espalhamento dinâmico da luz para as proteínas recombinantes



PRP IBMP	Massa (%)	Raio hidrodinâmico (nm)	Peso molecular (kDa)	Polidispersividade (%)
<b>Carbonato de sódio (50 mM pH 9,6)</b>				
8.1	94,0	2,3	24	7,2
8.2	99,8	3,8	76	15,5
8.3	97,9	3,9	80	10,2
8.4	97,7	4,2	98	14,3
<b>Fosfato de sódio (50 mM pH 7,5)</b>				
8.1	96,6	2,1	20	11,8
8.2	99,5	3,7	72	18,1
8.3	99,3	4,1	94	11,5
8.4	97,7	4,3	103	23,7
<b>MES (50 mM pH 5,5)</b>				
8.1	79,6	2,7	35	11,8
8.2	94,5	3,5	65	15,9
8.3	99,3	3,3	57	28,2
8.4	99,5	4,0	84	34,2

[00177] Padronização dos componentes do ELISA indireto

[00178] Os ensaios imunoenzimáticos indiretos no formato ELISA foram padronizados de forma a determinar a quantidade ótima das proteínas recombinantes, bem como a melhor titulação do anticorpo secundário (*checkboxoarder titration*) e das amostras séricas. Em microplacas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato (Nunc MaxiSorp®, EUA) foram distribuídos 100 µl da solução tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6) contendo quantidades distintas dos antígenos recombinantes (200, 100, 50, 25 e 12,5 ng). Cada um dos IBMP foi utilizado separadamente como antígeno de captura. Após adição dos antígenos, a sensibilização ocorreu através do acréscimo de 100 µl da solução WellChampion™ lote 130703 (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) por cavidade e, após um período de incubação de 15 min à temperatura ambiente, as microplacas foram esvaziadas por inversão e colocadas em estufa a 37°C por 20 minutos para secagem (Quimis® Estufa incubadora Q316M2, Diadema, Brasil). Ao final deste tempo, as microplacas encontravam-se prontas para uso. Para a padronização do ELISA indireto foram utilizadas em duplicata amostras séricas de quatro indivíduos negativos e três positivos para a doença de Chagas nas diluições de 25, 50, 100 e 200 vezes utilizando o tampão PBS-T

(fosfato de sódio 10 mM - Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, cloreto de sódio 150 mM - NaCl e Tween-20 0,05%, pH 7,2) acrescido de extrato de *E. coli* 2%. Seis cavidades sem adição de antígeno (somente tampão de diluição, denominadas “SS”) e seis cavidades sensibilizadas, porém sem adição de amostra sérica (denominadas “branco”) foram utilizadas como controle negativo. Após sensibilização, 100 µl das amostras séricas diluídas foram adicionadas a cada cavidade. As placas foram seladas e incubadas em estufa a 37°C por 60 min (Quimis® Estufa incubadora Q316M2, Diadema, Brasil). Ao final deste período e com auxílio da lavadora de microplacas Wellwash™ Microplater Washer (Thermo Scientific™, Finlândia), as placas foram lavadas cinco vezes com adição de 300 µl de tampão PBS-T para retirada do material não adsorvido. A cada ciclo de lavagem, o tampão era deixado em contato com as cavidades por 1 min. Em seguida, foram adicionados 100 µl do anticorpo secundário diluído em PBS-T em cada cavidade. O anticorpo secundário, lote 135EXCJAP0047, foi conjugado à peroxidase no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED, Biomanguinhos, FIOCRUZ-RJ). Trata-se de uma antiglobulina humana (anti-IgG) produzida a partir da inoculação de IgG humana em cabra, a qual encontrava-se em uma concentração final de 14 mg/mL. Para a padronização da reação de ELISA, o anticorpo secundário foi avaliado nas diluições de 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:4.000, 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000. As microplacas foram novamente seladas e incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos (Quimis® Estufa incubadora Q316M2, Diadema, Brasil). Ao final da incubação, as microplacas foram lavadas conforme descrito anteriormente. A cada cavidade foram adicionados 100 µL do substrato TMB Plus lote 111011 (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) e, após 10 minutos e sob abrigo da luz, adicionou-se 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M com objetivo de parar as reações, as quais foram quantificadas no fotômetro de microplacas Multiskan® FC (Thermo Scientific™, Finlândia) com filtro de 450 nm. Para a interpretação dos dados, os valores de DO obtidos das cavidades

denominadas branco foram subtraídos das DO das amostras. Em seguida as médias aritméticas dos valores das DO das amostras positivas e negativas foram calculadas, bem como os seus respectivos desvios padrão, utilizando o programa Microsoft Excel 2010. Os critérios estabelecidos para a determinação das condições ótimas basearam-se na maior distância entre a média aritmética das DO das amostras positivas daquela obtida para as amostras negativas acrescida à três desvios-padrão (DP). Além disto, foi estabelecido para esta padronização que a média aritmética das DO das amostras positivas deveriam obrigatoriamente ultrapassar valores de 1,000 e das amostras negativas não atingir o valor de 0,200, ou de 0,300 caso considerasse  $X \text{ DO} + 3\text{DP}$ .

A proteína IBMP-8.1 foi avaliada inicialmente utilizando as quantidades de 200, 100, 50, 25 e 12,5 ng do antígeno por cavidade, além de diferentes diluições do anticorpo conjugado (500, 1.000, 2.000 e 4.000 vezes) e das amostras séricas, a saber: 25 (Figuras 3A e 3B), 50 (Figuras 3C e 3D), 100 (Figuras 3E e 3F) e 200 vezes (Figuras 3G e 3H).

[00179] Posteriormente, o experimento foi repetido utilizando 50, 25 e 12,5 ng do antígeno por cavidade e amostras séricas diluídas 100 (Figuras 4A e 4B) e 200 vezes (Figuras 4C e 4D). Nesta nova situação o conjugado foi usado quando diluído 20.000, 40.000 e 80.000 vezes.

[00180] A maior diferença encontrada entre a média aritmética do sinal (DO) das amostras positivas e a média aritmética do sinal das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi encontrada ao utilizar 25 ng da proteína IBMP-8.1 por cavidade somada à diluição sérica de 100 vezes e do conjugado de 40.000.

[00181] Tabela 13: Análise da densidade ótica das amostras submetidas à proteína recombinante 8.1 (PRP-IBMP-8.1):

Conjugado	PRP IBMP	Soro	$\bar{X}$ DO NEG	$\sigma$	$\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$	$\bar{X}$ DO POS	$(\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ ) - ( $\bar{X}$ DO POS)
1:20.000	50 ng	1:100	0,369	0,060	0,550	1,568	1,018
		1:200	0,267	0,095	0,551	1,487	0,936
	25 ng	1:100	0,408	0,280	1,247	1,784	0,536
		1:200	0,263	0,041	0,387	1,389	1,002
	12,5 ng	1:100	0,327	0,091	0,600	1,592	0,992
		1:200	0,226	0,049	0,371	1,360	0,988
1:40.000	50 ng	1:100	0,180	0,044	0,313	1,325	1,012
		1:200	0,159	0,045	0,296	1,040	0,744
	25 ng	1:100	0,179	0,034	0,280	1,302	<b>1,022</b>
		1:200	0,153	0,023	0,223	1,017	0,794
	12,5 ng	1:100	0,178	0,028	0,263	1,073	0,810
		1:200	0,158	0,015	0,202	0,927	0,724
1:80.000	50 ng	1:100	0,149	0,031	0,243	0,806	0,564
		1:200	0,134	0,031	0,227	0,548	0,322
	25 ng	1:100	0,146	0,024	0,218	0,798	0,580
		1:200	0,133	0,025	0,208	0,585	0,377
	12,5 ng	1:100	0,145	0,009	0,173	0,734	0,561
		1:200	0,120	0,021	0,183	0,583	0,400

[00182] A proteína recombinante 8.2 (PRP-IBMP-8.2) foi avaliada nas quantidades de 50, 25 e 12,5 ng por cavidade e amostras séricas diluídas 100 (Figuras 5A e 5B) e 200 vezes (Figuras 5C e 5D). O conjugado foi usado quando diluído 20.000, 40.000 e 80.000 vezes. A análise da DO demonstrou que a maior diferença observada entre a média aritmética do sinal das amostras positivas e a média aritmética do sinal das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi conseguida utilizando 12,5 ng do antígeno, aliada à diluição sérica de 100 vezes e do anticorpo secundário de 40.000, conforme Tabela 14.

[00183] Tabela 14: Análise da densidade ótica das amostras submetidas à proteína recombinante 8.2 (PRP-IBMP-8.2)

Conjugado	PRP IBMP	Soro	$\bar{X}$ DO NEG	$\sigma$	$\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$	$\bar{X}$ DO POS	$(\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ ) - $(\bar{X}$ DO POS)
1:20.000	50 ng	1:100	0,846	0,329	1,835	2,322	0,487
		1:200	0,624	0,318	1,579	1,772	0,193
	25 ng	1:100	0,439	0,157	0,910	1,758	0,848
		1:200	0,345	0,253	1,105	1,529	0,424
	12,5 ng	1:100	0,366	0,064	0,558	1,297	0,739
		1:200	0,337	0,127	0,718	1,412	0,694
1:40.000	50 ng	1:100	0,489	0,197	1,080	1,388	0,308
		1:200	0,324	0,110	0,654	1,043	0,389
	25 ng	1:100	0,196	0,042	0,324	1,118	0,795
		1:200	0,171	0,024	0,243	0,890	0,647
	12,5 ng	1:100	0,196	0,027	0,276	1,097	<b>0,821</b>
		1:200	0,239	0,094	0,521	0,841	0,320
1:80.000	50 ng	1:100	0,348	0,124	0,719	0,968	0,248
		1:200	0,244	0,067	0,445	0,702	0,256
	25 ng	1:100	0,191	0,097	0,483	0,755	0,273
		1:200	0,160	0,063	0,349	0,613	0,264
	12,5 ng	1:100	0,156	0,008	0,179	0,738	0,559
		1:200	0,145	0,026	0,223	0,580	0,357

[00184] A proteína recombinante IBMP 8.3 (PRP-IBMP-8.3) foi avaliado nas quantidades de 50, 25 e 12,5 ng por cavidade e diluições séricas de 1:100 (Figuras 6A e 6B) e 1:200 (Figuras 6C e 6D). O conjugado foi usado quando diluído 20.000, 40.000 e 80.000 vezes. A maior diferença observada entre a média aritmética das DO das amostras positivas e a média aritmética das DO das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi de 1,335, conforme Tabela 15.

[00185] Tabela 15: Análise da densidade ótica das amostras submetidas à proteína IBMP 8.3 (PRP-IBMP-8.3)

Conjugado	PRP IBMP	Soro	$\bar{X}$ DO NEG	$\sigma$	$\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$	$\bar{X}$ DO POS	$(\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ ) - ( $\bar{X}$ DO POS)
1:20.000	50 ng	1:100	0,647	0,304	1,560	2,356	0,797
		1:200	0,482	0,299	1,378	2,334	0,956
	25 ng	1:100	0,572	0,254	1,334	2,488	1,154
		1:200	0,359	0,241	1,083	2,244	1,161
	12,5 ng	1:100	0,518	0,223	1,186	2,453	1,268
		1:200	0,343	0,246	1,082	2,023	0,941
1:40.000	50 ng	1:100	0,328	0,131	0,722	1,490	0,768
		1:200	0,224	0,106	0,543	1,269	0,726
	25 ng	1:100	0,192	0,026	0,271	1,607	1,335
		1:200	0,206	0,108	0,531	1,246	0,715
	12,5 ng	1:100	0,303	0,141	0,725	1,461	0,736
		1:200	0,221	0,069	0,428	1,184	0,756
1:80.000	50 ng	1:100	0,218	0,092	0,493	1,119	0,626
		1:200	0,131	0,015	0,175	0,958	0,783
	25 ng	1:100	0,261	0,186	0,820	1,129	0,309
		1:200	0,140	0,038	0,254	0,806	0,552
	12,5 ng	1:100	0,219	0,127	0,601	0,947	0,346
		1:200	0,144	0,034	0,246	0,704	0,458

[00186] A otimização dos componentes do ELISA para a proteína recombinante 8.4 (PRP-IBMP-8.4) foi realizada utilizando o antígeno nas quantidades de 50, 25 e 12,5 ng por cavidade e amostras séricas diluídas 100 (Figuras 7A e 7B) e 200 vezes (Figuras 7C e 7D). Conforme Tabela 16, a maior diferença encontrada entre a média aritmética da DO das amostras positivas e a média aritmética da DO das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi de 1,414 ao utilizar 25 ng do PRP-IBMP-8.4 somada à diluição sérica de 1:100 e do anticorpo secundário 1:40.000.

[00187] Tabela 16: Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao PRP-IBMP-8.4

Conjugado	PRP IBMP	Soro	$\bar{X}$ DO NEG	$\sigma$	$\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$	$\bar{X}$ DO POS	$(\bar{X}$ DO NEG + 3 $\sigma$ ) - ( $\bar{X}$ DO POS)
1:20.000	50 ng	1:100	0,405	0,159	0,883	2,267	1,383
		1:200	0,307	0,168	0,810	2,042	1,232
	25 ng	1:100	0,384	0,141	0,808	2,141	1,333
		1:200	0,288	0,180	0,829	1,903	1,074
	12,5 ng	1:100	0,342	0,148	0,787	2,086	1,300
		1:200	0,203	0,069	0,412	1,776	1,364
1:40.000	50 ng	1:100	0,236	0,049	0,384	1,779	1,394
		1:200	0,163	0,016	0,211	1,536	1,325
	25 ng	1:100	0,179	0,024	0,252	1,667	1,414
		1:200	0,165	0,016	0,213	1,404	1,191
	12,5 ng	1:100	0,219	0,060	0,398	1,402	1,003
		1:200	0,184	0,039	0,299	1,183	0,884
1:80.000	50 ng	1:100	0,134	0,008	0,160	0,995	0,836
		1:200	0,117	0,006	0,134	0,813	0,679
	25 ng	1:100	0,133	0,006	0,152	0,889	0,737
		1:200	0,113	0,006	0,130	0,718	0,588
	12,5 ng	1:100	0,128	0,007	0,149	0,730	0,581
		1:200	0,117	0,008	0,140	0,610	0,469

### Exemplo 8 - Avaliação do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) como agentes bloqueadores

[00188] Com o objetivo de aperfeiçoar os resultados obtidos na padronização dos componentes do ELISA indireto, foi investigada a adição de SFB nas concentrações de 10,0%, 5,0% e 2,5% e de BSA nas concentrações de 2,0%, 1,0% e 0,5% ao tampão de diluição das amostras séricas. As reações de ELISA foram realizadas conforme descrito acima. Para esta finalidade, foram utilizadas amostras séricas de 54 indivíduos negativos e 36 positivos para a doença de Chagas. Os resultados foram analisados de acordo com diferenças estatísticas das médias geométricas dos índices de reatividade (IR; relação DO/CO) das amostras positivas e negativas para cada uma das condições testadas e dos parâmetros de desempenho determinados.

[00189] A adição de SFB ou BSA ao tampão de diluição de amostras (PBS-T) revelou valores variados dos IR médios para as amostras positivas e negativas quando comparados a não adição dos mesmos. Tais resultados

encontram-se descritos na Tabela 17 e apresentados na Figura 8.

[00190] Tabela 17: Índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando SFB e BSA

PRP IBMP	Agente bloqueador	AMOSRAS POSITIVAS				AMOSTRAS NEGATIVAS			
		IR	IC95%	$\sigma$	CV	IR	IC95%	$\sigma$	CV
8.1	SFB 2,5%	4,64	4,27-5,04	1,28	0,28	0,27	0,23-0,32	1,79	6,62
	SFB 5%	2,74	2,19-3,43	1,94	0,71	0,45	0,42-0,50	1,38	3,04
	SFB 10%	2,97	2,41-3,66	1,85	0,62	0,46	0,42-0,49	1,34	2,94
	<b>SEM SFB SEM BSA</b>	2,40	1,96-2,94	1,82	0,76	0,32	0,29-0,36	1,49	4,60
	BSA 0,5%	2,56	2,07-3,17	1,88	0,74	0,39	0,36-0,43	1,39	3,56
	BSA 1%	1,81	1,46-2,24	1,88	1,04	0,37	0,33-0,41	1,48	4,02
	BSA 2%	2,99	2,52-3,55	1,66	0,55	0,58	0,54-0,62	1,28	2,20
8.2	SFB 2,5%	1,50	1,24-1,82	1,77	1,18	0,62	0,57-0,66	1,31	2,13
	SFB 5%	1,89	1,61-2,22	1,61	0,85	0,61	0,56-0,66	1,34	2,20
	SFB 10%	1,84	1,37-2,47	2,40	1,31	0,64	0,60-0,69	1,32	2,05
	<b>SEM SFB SEM BSA</b>	1,84	1,55-2,18	1,66	0,90	0,45	0,42-0,49	1,29	2,84
	BSA 0,5%	2,05	1,69-2,48	1,76	0,86	0,45	0,40-0,50	1,53	3,42
	BSA 1%	2,28	1,89-2,75	1,74	0,77	0,61	0,55-0,67	1,43	2,34
	BSA 2%	1,66	1,41-1,96	1,63	0,98	0,54	0,50-0,59	1,33	2,45
8.3	SFB 2,5%	2,61	2,08-3,28	1,95	0,75	0,39	0,35-0,43	1,44	3,72
	SFB 5%	2,16	1,86-2,51	1,56	0,72	0,38	0,33-0,42	1,55	4,11
	SFB 10%	2,15	1,77-2,62	1,79	0,83	0,36	0,32-0,40	1,50	4,14
	<b>SEM SFB SEM BSA</b>	2,09	1,78-2,45	1,60	0,76	0,30	0,28-0,33	1,39	4,55
	BSA 0,5%	4,04	3,43-4,75	1,62	0,40	0,48	0,43-0,55	1,61	3,32
	BSA 1%	2,75	2,34-3,24	1,62	0,59	0,40	0,37-0,43	1,31	3,26
	BSA 2%	3,14	2,69-3,66	1,58	0,50	0,45	0,42-0,48	1,24	2,76
8.4	SFB 2,5%	2,03	1,84-2,25	1,34	0,66	0,38	0,34-0,42	1,50	4,00
	SFB 5%	2,05	1,86-2,25	1,32	0,65	0,37	0,34-0,40	1,35	3,62
	SFB 10%	1,97	1,79-2,16	1,32	0,67	0,43	0,40-0,46	1,31	3,07
	<b>SEM SFB SEM BSA</b>	2,27	2,06-2,50	1,34	0,59	0,24	0,22-0,27	1,40	5,79
	BSA 0,5%	2,64	2,31-3,00	1,47	0,56	0,26	0,24-0,29	1,50	5,69
	BSA 1%	3,57	3,21-3,98	1,37	0,38	0,39	0,35-0,43	1,40	3,61
	BSA 2%	3,16	2,81-3,56	1,41	0,45	0,52	0,49-0,56	1,26	2,41

[00191] Os parâmetros de desempenho determinados para os casos de adição de SFB e BSA às proteínas recombinantes encontram-se sumarizados na Tabela 18. Além disso, são também mostrados os dados referentes à utilização do tampão de amostra sem acréscimo dos agentes bloqueadores.



[00192] Tabela 18: Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP utilizando SFB e BSA

PRP IBMP	Agente bloqueador	AUC (IC95%)	Sen (%) (IC95%)	Esp (%) (IC95%)	Exa (%) (IC95%)	J (%)
8.1	SFB 2,5%	1,00	100 (90,4-100)	100 (93,4-100)	100 (95,9-100)	100
	SFB 5%	0,99 (0,97-1,00)	88,9 (74,7-95,6)	96,3 (87,5-99,0)	93,3 (86,2-96,9)	85,2
	SFB 10%	0,99 (0,97-1,00)	91,7 (78,2-97,1)	100 (93,4-100)	96,7 (90,7-98,9)	91,7
	SEM SFB	0,99 (0,99-1,00)	94,4 (81,9-98,5)	100 (93,4-100)	97,8 (92,3-99,4)	94,4
	SEM BSA	0,99 (0,99-1,00)	94,4 (81,9-98,5)	100 (93,4-100)	97,8 (92,3-99,4)	94,4
	BSA 0,5%	0,99 (0,97-1,00)	88,9 (74,7-95,6)	98,1 (90,2-99,7)	94,4 (87,6-97,6)	87,0
	BSA 1%	0,97 (0,92-1,00)	83,3 (68,1-92,1)	98,1 (90,2-99,7)	92,2 (84,8-96,2)	81,5
8.2	BSA 2%	0,99 (0,99-1,00)	97,2 (85,8-99,5)	100 (93,4-100)	98,9 (94,0-99,8)	97,2
	SFB 2,5%	0,96 (0,90-1,00)	75,0 (58,9-86,2)	98,1 (90,2-99,7)	88,9 (80,7-93,9)	73,1
	SFB 5%	0,99 (0,98-1,00)	86,1 (71,3-93,9)	100 (93,4-100)	94,4 (87,6-97,6)	86,1
	SFB 10%	0,97 (0,91-1,00)	91,7 (78,2-97,1)	98,1 (90,2-99,7)	95,6 (89,1-98,3)	89,8
	SEM SFB	0,99 (0,98-1,00)	97,1 (85,5-99,5)	100 (93,4-100)	98,9 (93,9-99,8)	97,1
	SEM BSA	0,99 (0,98-1,00)	97,1 (85,5-99,5)	100 (93,4-100)	98,9 (93,9-99,8)	97,1
	BSA 0,5%	0,98 (0,96-1,00)	86,1 (71,3-93,9)	96,3 (87,5-99,0)	92,2 (84,8-96,2)	82,4
8.3	BSA 1%	0,98 (0,95-1,00)	94,4 (81,9-98,5)	92,6 (82,4-97,1)	93,3 (86,2-96,9)	87,0
	BSA 2%	0,98 (0,96-1,00)	80,6 (65,0-90,2)	98,1 (90,2-99,7)	91,1 (83,4-95,4)	78,7
	SFB 2,5%	0,98 (0,94-1,00)	94,4 (81,9-98,5)	100 (93,4-100)	97,8 (92,3-99,4)	94,4
	SFB 5%	0,98 (0,95-1,00)	94,4 (81,9-98,5)	100 (93,4-100)	97,8 (92,3-99,4)	94,4
	SFB 10%	0,98 (0,94-1,00)	94,4 (81,9-98,5)	100 (93,4-100)	97,8 (92,3-99,4)	94,4
	SEM SFB	0,99 (0,98-1,00)	97,2 (85,8-99,5)	100 (93,4-100)	98,9 (94,0-99,8)	97,2
	SEM BSA	0,99 (0,98-1,00)	97,2 (85,8-99,5)	100 (93,4-100)	98,9 (94,0-99,8)	97,2
8.4	BSA 0,5%	0,99 (0,98-1,00)	97,2 (85,8-99,5)	96,3 (87,5-99,0)	96,7 (90,7-98,9)	93,5
	BSA 1%	0,99 (0,97-1,00)	94,4 (81,9-98,5)	100 (93,4-100)	97,8 (92,3-99,4)	94,4
	BSA 2%	0,99 (0,98-1,00)	97,2 (85,8-99,5)	100 (93,4-100)	98,9 (94,0-99,8)	97,2
	SFB 2,5%	0,99 (0,99-1,00)	97,2 (85,8-99,5)	100 (90,4-100)	98,9 (94,0-99,8)	97,2
	SFB 5%	0,99 (0,99-1,00)	97,2 (85,8-99,5)	100 (90,4-100)	98,9 (94,0-99,8)	97,2
	SFB 10%	1,00	100 (90,4-100)	100 (93,4-100)	100 (95,9-100)	100
	SEM SFB	1,00	100 (90,4-100)	100 (93,4-100)	100 (95,9-100)	100
8.4	SEM BSA	1,00	100 (90,4-100)	100 (93,4-100)	100 (95,9-100)	100
	BSA 0,5%	0,99 (0,99-1,00)	97,2 (85,8-99,5)	100 (90,4-100)	98,9 (94,0-99,8)	97,2
	BSA 1%	1,00	100 (90,4-100)	100 (93,4-100)	100 (95,9-100)	100
	BSA 2%	1,00	100 (90,4-100)	100 (93,4-100)	100 (95,9-100)	100

Exemplo 9 - Avaliação da estabilidade estrutural e funcional das proteínas IBMP 8-1 a 8-4

[00193] Estabilidade a temperaturas extremas:

[00194] A estabilidade a temperaturas extremas foi realizada utilizando o sistema-tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6), foi determinada por desnaturação e renaturação através de aumento e posterior diminuição de temperatura e aquisição de dados por DC. O espectropolarímetro foi programado para gerar médias espectrais a partir de quatro aquisições e, em

cada uma delas, mediu-se a elipcidade em graus na região do UV, no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 202 nm, com uma velocidade de 100 nm/min. Durante a desnaturação, as aquisições foram obtidas a cada 10°C, variando de 5°C a 85°C. Para a renaturação aquisições também foram obtidas a cada 10°C, porém no sentido inverso, ou seja, de 85°C a 5°C. Ao inserir no mesmo gráfico os espectros de desnaturação e renaturação à 5°C foi possível calcular a reversibilidade da desnaturação através da diferença do sinal de CD a 202 nm. Os resultados dos experimentos conduzidos no espectropolarímetro foram comparados com análises cuja desnaturação térmica foi obtida com auxílio do termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf GA, Hamburgo, Alemanha). Entretanto, neste caso, o equipamento foi programado para permanecer 1, 5 e 10 minutos em cada patamar de temperatura. Ao final do ciclo de aquecimento e resfriamento a integridade das proteínas IBMP foi verificada por SDS-PAGE e a análise funcional através da reação do ELISA indireto utilizando 22 amostras negativas e 22 positivas para a doença de Chagas. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenho foram determinados para verificação do reconhecimento dos antígenos pré e pós-submissão às diferentes condições desnaturantes. O decaimento de reatividade foi avaliado ao comparar à reatividade dos antígenos no ponto zero (pré) daquela obtida nos pontos de 1, 5 e 10 minutos (pós).

[00195] A Figura 9 mostra os espectros de desnaturação e renaturação para as proteínas recombinantes (PRP-IBMP).

[00196] O ensaio para verificação de reversibilidade da desnaturação, realizado utilizando a temperatura de 5°C no início e ao final do ensaio a 202 nm, mostrou que 92,3%, 85,5% e 98,8% do PRP-IBMP-8.1 (Figura 10A), 8.2 (Figura 10B) e 8.4 (Figura 10D), respectivamente, retornaram ao seu estado inicial de conformação. Para o PRP-IBMP-8.3, somente 9,2% retornou à sua conformação inicial, ficando 90,8% na forma precipitada (Figura 10C).

[00197] A Figura 11 mostra o perfil proteico dos PRP-IBMP após submissão a temperaturas extremas.

[00198] Os valores médios dos IR gerados a partir da análise funcional encontram-se descritos na Tabela 19 e as análises gráficas na Figura 12.

[00199] Tabela 19: Índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas

PRP IBMP	Condição de estresse	AMOSTRAS POSITIVAS				AMOSTRAS NEGATIVAS			
		IR	IC95%	$\sigma$	CV	IR	IC95%	$\sigma$	CV
8.1	Nativa	2,93	2,50-3,43	1,43	0,49	0,29	0,26-0,32	1,30	4,53
	1 minuto	2,96	2,52-3,47	1,44	0,49	0,31	0,28-0,35	1,32	4,23
	10 minutos	1,62	1,23-2,13	1,86	1,15	0,31	0,24-0,41	1,84	5,96
	20 minutos	1,69	1,38-2,06	1,58	0,94	0,31	0,26-0,37	1,44	4,64
8.2	Nativa	2,80	2,33-3,36	1,51	0,54	0,31	0,27-0,36	1,39	4,46
	1 minuto	3,51	2,92-4,22	1,52	0,43	0,34	0,32-0,37	1,16	3,39
	10 minutos	3,35	2,66-4,69	1,90	0,54	0,34	0,26-0,44	1,77	5,23
	20 minutos	3,19	2,49-4,07	1,74	0,55	0,29	0,25-0,34	1,42	4,86
8.3	Nativa	2,72	2,42-3,07	1,31	0,48	0,24	0,21-0,28	1,39	5,75
	1 minuto	3,20	2,80-3,66	1,35	0,42	0,28	0,25-0,31	1,27	4,60
	10 minutos	3,08	2,35-4,05	1,85	0,60	0,17	0,14-0,21	1,66	9,70
	20 minutos	2,37	1,89-2,98	1,67	0,70	0,10	0,08-0,12	1,68	17,03
8.4	Nativa	2,84	2,51-3,22	1,32	0,47	0,26	0,21-0,32	1,59	6,12
	1 minuto	2,56	2,24-2,91	1,34	0,52	0,24	0,19-0,30	1,71	7,24
	10 minutos	3,69	2,97-4,58	1,63	0,44	0,26	0,23-0,30	1,36	5,24
	20 minutos	3,40	2,81-4,11	1,53	0,45	0,20	0,17-0,24	1,47	7,29

[00200] A reprodutibilidade do primeiro ponto da avaliação (proteína nativa) foi comparada com os subsequentes e a determinação do índice de Kappa de Cohen encontra-se descrita na Tabela 20. A Tabela 21 descreve os parâmetros de desempenho para cada uma das condições avaliadas.

[00201] Tabela 20: Concordância obtida da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas:

Condição de estresse	PROTEÍNA NATIVA							
	PRP-IBMP-8.1		PRP-IBMP-8.2		PRP-IBMP-8.3		PRP-IBMP-8.4	
	$\kappa$	IC95%	$\kappa$	IC95%	$\kappa$	IC95%	$\kappa$	IC95%
1 min	1,00	-	1,00	-	1,00	-	0,95	0,87-1,00
10 min	0,73	0,52-0,93	0,95	0,87-1,00	0,95	0,87-1,00	0,95	0,87-1,00
20 min	0,86	0,71-1,00	0,95	0,87-1,00	0,95	0,87-1,00	0,95	0,87-1,00

[00202] Tabela 21: Parâmetros de desempenho obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperaturas extremas:

PRP IBMP	Condição de estresse	Sen (%) (IC95%)	Esp (%) (IC95%)	Exa (%) (IC95%)	J (%)
8.1	Nativa	100 (85,1-100)	100 (85,1-100)	100 (92,0-100)	100
	1 min	100 (85,1-100)	100 (85,1-100)	100 (92,0-100)	100
	10 min	72,7 (51,8-86,8)	100 (85,1-100)	86,4 (73,3-93,6)	72,7
	20 min	86,4 (66,7-95,3)	100 (85,1-100)	93,2 (81,8-97,7)	86,4
8.2	Nativa	100 (85,1-100)	100 (85,1-100)	100 (92,0-100)	100
	1 min	100 (85,1-100)	100 (85,1-100)	100 (92,0-100)	100
	10 min	95,5 (78,2-99,2)	100 (85,1-100)	97,7 (88,2-99,6)	95,5
	20 min	95,5 (78,2-99,2)	100 (85,1-100)	97,7 (88,2-99,6)	95,5
8.3	Nativa	100 (85,1-100)	100 (85,1-100)	100 (92,0-100)	100
	1 min	100 (85,1-100)	100 (85,1-100)	100 (92,0-100)	100
	10 min	95,5 (78,2-99,2)	100 (85,1-100)	97,7 (88,2-99,6)	95,5
	20 min	95,5 (78,2-99,2)	100 (85,1-100)	97,7 (88,2-99,6)	95,5
8.4	Nativa	100 (85,1-100)	100 (85,1-100)	100 (92,0-100)	100
	1 min	95,5 (78,2-99,2)	100 (85,1-100)	97,7 (88,2-99,6)	95,5
	10 min	95,5 (78,2-99,2)	100 (85,1-100)	97,7 (88,2-99,6)	95,5
	20 min	95,5 (78,2-99,2)	100 (85,1-100)	97,7 (88,2-99,6)	95,5

[00203] Estabilidade a temperatura ambiente

[00204] As proteínas recombinantes foram incubadas a 25°C em sistema-tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6) em uma incubadora com temperatura controlada e sem agitação (Innova® 40 Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific, EUA). A verificação de alterações estruturais dos antígenos foi realizada por DC nos tempos de 0, 24, 72 e 96 horas. O espectropolarímetro foi programado para gerar médias espectrais a partir de quatro aquisições e, em cada uma delas, mediu-se a elipicidade em graus na região do UV, no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 200 nm, com uma velocidade de 100 nm/min. Através da análise da diferença do sinal de CD à 200 nm foi possível calcular quantidade estruturas secundárias resultantes nos diferentes momentos de análise. A verificação da integridade das bandas foi realizada por meio de SDS-PAGE e a análise funcional através da reação de ELISA indireto, incluindo nesta abordagem o

tempo de 120 horas. Assim, 46 amostras negativas e 46 positivas para a doença de Chagas foram submetidas à reação de ELISA. A avaliação das proteínas pré e pós-submissão às diferentes condições desnaturantes foi realizada através da determinação das médias geométricas dos IR e dos parâmetros de desempenhos. O decaimento do IR foi avaliado ao comparar à reatividade dos antígenos antes e após estresse térmico.

[00205] No sistema-tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6), o PRP-IBMP-8.1 apresentou precipitação de 10,1%, 14,0% e 18,6% nos tempos de 24, 72 e 96 horas a 25°C, respectivamente, quando comparado com a proteína nativa (Figura 13A). Para o PRP-IBMP-8.2, os valores apresentados foram de 59,2%, 93,8% e 100%, respectivamente (Figura 13B). Quanto ao PRP-IBMP-8.3 foi verificada precipitação de 2,1% após 24h, 9,2% após 72h e 41,7% após 96h (Figura 13C). E, na avaliação do PRP-IBMP-8.4 foi observada 1,3% de precipitação das amostras após 24h, 13,2% após 72h e 54,5% após 96h (Figura 13D).

[00206] A integridade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) foi avaliada por SDS-PAGE e os seus resultados estão demonstrados na Figura 14. Os valores médios dos IR determinados para as proteínas recombinantes (PRP-IBMP) em cada uma das condições analisadas estão descritos na Tabela 22, indicando que, apesar da degradação observada em alguns pontos de análise, as proteínas recombinantes (PRP-IBMP) continuaram a ser reconhecidos por anticorpos anti-*T. cruzi* presentes nas amostras séricas positivas para a doença de Chagas. A Figura 15, além de apresentar os resultados em forma gráfica, descreve a relação estatística entre as condições de análise, mensurada pelo método de Wilcoxon.

[00207] Tabela 22: Índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade das proteínas recombinantes (PRP-IBMP) a temperatura ambiente.

PRP IBMP	Condição de estresse	AMOSTRAS POSITIVAS				AMOSTRAS NEGATIVAS			
		IR	IC95%	$\sigma$	CV	IR	IC95%	$\sigma$	CV
8.1	Nativa	2,68	2,34-3,07	1,58	0,59	0,32	0,30-0,35	1,30	4,05
	24 h	2,12	1,84-2,45	1,62	0,77	0,50	0,45-0,55	1,39	2,80
	48 h	1,54	1,32-1,78	1,65	1,08	0,37	0,33-0,41	1,50	4,08
	72 h	1,00	0,88-1,14	1,57	1,57	0,49	0,44-0,54	1,41	2,88
	96 h	1,10	0,96-1,25	1,56	1,42	0,40	0,36-0,46	1,55	3,83
	120 h	0,60	0,39-0,92	4,27	7,16	0,25	0,19-0,31	2,24	9,04
8.2	Nativa	2,35	2,10-2,64	1,48	0,63	0,40	0,34-0,46	1,66	4,15
	24 h	2,78	2,40-3,24	1,66	0,60	0,35	0,31-0,40	1,58	4,51
	48 h	2,69	2,35-3,09	1,59	0,59	0,41	0,37-0,45	1,39	3,40
	72 h	2,68	2,32-3,11	1,64	0,61	0,49	0,45-0,54	1,34	2,73
	96 h	2,11	1,80-2,48	1,72	0,82	0,40	0,34-0,48	1,80	4,49
	120 h	2,69	2,27-3,18	1,78	0,66	0,38	0,35-0,42	1,39	3,65
8.3	Nativa	3,03	2,71-3,38	1,45	0,48	0,32	0,28-0,35	1,43	4,53
	24 h	2,72	2,39-3,09	1,55	0,57	0,32	0,29-0,36	1,44	4,43
	48 h	2,52	2,22-2,85	1,53	0,61	0,32	0,29-0,36	1,48	4,61
	72 h	2,26	1,95-2,63	1,66	0,74	0,35	0,32-0,39	1,33	3,77
	96 h	2,17	1,86-2,53	1,68	0,77	0,28	0,24-0,32	1,65	5,92
	120 h	2,38	2,08-2,72	1,57	0,66	0,36	0,31-0,41	1,59	4,44
8.4	Nativa	2,61	2,36-2,89	1,40	0,54	0,34	0,29-0,39	1,62	4,79
	24 h	1,56	1,34-1,82	1,68	1,07	0,33	0,29-0,37	1,53	4,65
	48 h	1,18	1,03-1,35	1,57	1,33	0,38	0,33-0,43	1,54	4,09
	72 h	0,87	0,75-1,00	1,61	1,86	0,37	0,33-0,42	1,46	3,91
	96 h	0,86	0,71-1,05	1,93	2,24	0,40	0,34-0,46	1,64	4,14
	120 h	0,57	0,49-0,67	1,72	3,02	0,34	0,28-0,42	1,94	5,64

[00208] A reprodutibilidade do primeiro período da avaliação (proteína nativa) foi comparada aos subsequentes e a determinação do índice de Kappa de Cohen encontra-se descrita na Tabela 23. Os parâmetros de desempenho referentes a cada uma das condições de análise estão descritos na Tabela 24.

[00209] Tabela 23: Concordância obtida da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente.

Condição de estresse	PROTEÍNA NATIVA							
	PRP-IBMP-8.1		PRP-IBMP-8.2		PRP-IBMP-8.3		PRP-IBMP-8.4	
	$\kappa$	IC95%	$\kappa$	IC95%	$\kappa$	IC95%	$\kappa$	IC95%
24 h	0,87	0,77-0,97	0,96	0,90-1,00	0,96	0,90-1,00	0,80	0,68-0,93
48 h	0,83	0,71-0,94	0,93	0,86-1,00	0,93	0,86-1,00	0,67	0,52-0,82
72 h	0,46	0,27-0,64	0,93	0,86-1,00	0,91	0,83-1,00	0,48	0,30-0,66
96 h	0,48	0,30-0,66	0,85	0,74-0,96	0,89	0,80-0,98	0,50	0,32-0,68
120 h	0,43	0,25-0,62	0,91	0,83-1,00	0,93	0,86-1,00	0,09	0,01-0,30

[00210] Tabela 24: Parâmetros de desempenho obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a temperatura ambiente.

PRP IBMP	Condição de estresse	Sen (%) (IC95%)	Esp (%) (IC95%)	Exa (%) (IC95%)	J (%)
8.1	Nativa	100 (92,3-100)	100 (92,3-100)	100 (96,0-100)	100
	24 h	89,1 (77,0-95,3)	97,8 (88,7-99,6)	93,5 (86,5-97,0)	87,0
	48 h	82,6 (69,3-90,9)	100 (92,3-100)	82,6 (83,8-95,5)	82,6
	72 h	50,0 (36,1-63,9)	95,7 (85,5-98,8)	72,8 (63,0-80,9)	45,7
	96 h	54,3 (40,2-67,8)	93,5 (82,5-97,8)	73,9 (64,1-81,8)	47,8
	120 h	43,5 (30,2-57,8)	100 (92,3-100)	71,7 (61,8-79,9)	43,5
8.2	Nativa	100 (92,3-100)	100 (92,3-100)	100 (96,0-100)	100
	24 h	97,8 (88,7-99,6)	97,8 (88,7-99,6)	97,8 (92,4-99,4)	95,7
	48 h	95,7 (85,5-98,8)	97,8 (88,7-99,6)	96,7 (90,8-98,9)	93,5
	72 h	95,7 (85,5-98,8)	97,8 (88,7-99,6)	96,7 (90,8-98,9)	93,5
	96 h	89,1 (77,0-95,3)	93,5 (82,5-97,8)	91,3 (83,8-95,5)	82,6
	120 h	91,3 (79,7-96,6)	100 (92,3-100)	95,7 (89,3-98,3)	91,3
8.3	Nativa	100 (92,3-100)	100 (92,3-100)	100 (96,0-100)	100
	24 h	97,8 (88,7-99,6)	97,8 (88,7-99,6)	97,8 (92,4-99,4)	95,7
	48 h	93,5 (82,5-97,8)	100 (92,3-100)	96,7 (90,8-98,9)	93,5
	72 h	91,3 (79,7-96,6)	100 (92,3-100)	95,7 (89,3-98,3)	91,3
	96 h	91,3 (79,7-96,6)	97,8 (88,7-99,6)	94,6 (87,9-97,7)	89,1
	120 h	97,8 (88,4-99,6)	97,8 (88,7-99,6)	97,8 (92,3-99,4)	95,6
8.4	Nativa	100 (92,3-100)	100 (92,3-100)	100 (96,0-100)	100
	24 h	80,4 (66,8-89,3)	100 (92,3-100)	90,2 (82,4-94,8)	80,4
	48 h	69,6 (55,2-80,9)	97,8 (88,7-99,6)	83,7 (74,8-89,9)	67,4
	72 h	47,8 (34,1-61,9)	100 (92,3-100)	73,9 (64,1-81,8)	47,8
	96 h	43,5 (30,2-57,8)	93,5 (82,5-97,8)	68,5 (58,4-77,1)	37,0
	120 h	17,4 (9,1-30,7)	95,7 (85,5-98,8)	56,5 (46,3-66,2)	13,0

[00211] Estabilidade de longa duração

[00212] O objetivo deste experimento foi investigar a reatividade dos IBMP por um período prolongado. Para tal, oito microplacas de cada antígeno foram sensibilizadas e armazenadas a 4°C em embalagens individuais cuidadosamente lacradas na presença de agente dessecante. Para a realização dos ensaios imunoenzimáticos, 46 amostras negativas e 46 positivas para a doença de Chagas foram aliquotadas em oito conjuntos e armazenadas 20°C. Os testes foram realizados entre os dias 15 e 20, totalizando oito pontos de análise distribuídos em um período de doze meses. Em cada um deles, as

microplacas e um conjunto de amostras séricas eram removidas do armazenamento e a reação de ELISA realizada. A determinação dos parâmetros de desempenho e das médias geométricas dos IR foi realizada para cada um dos pontos de análise. Já o decaimento de reatividade foi analisado ao comparar à reatividade dos antígenos no ponto inicial daquela obtida para os períodos subsequentes.

[00213] Os valores médios dos IR encontrados para as proteínas recombinantes (PRP-IBMP) estão descritos na Tabela 25 e as representações gráficas na Figura 16.

[00214] Tabela 25: Índices de reatividade obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração.

PRP IBMP	Pontos de análise	AMOSTRAS POSITIVAS				AMOSTRAS NEGATIVAS			
		IR	IC95%	$\sigma$	CV	IR	IC95%	$\sigma$	CV
8.1	AGO/2014	3,15	2,69-3,69	1,70	0,54	0,49	0,45-0,53	1,35	2,76
	SET/2014	3,09	2,59-3,70	1,83	0,59	0,50	0,43-0,58	1,62	3,24
	OUT/2014	2,79	2,37-3,28	1,73	0,62	0,50	0,45-0,56	1,45	2,92
	NOV/2014	2,62	2,16-3,17	1,91	0,73	0,42	0,37-0,46	1,44	3,46
	DEZ/2014	2,81	2,49-3,18	1,51	0,54	0,44	0,41-0,48	1,29	2,92
	JAN/2015	2,37	1,97-2,85	1,86	0,78	0,46	0,42-0,50	1,33	2,91
	ABR/2015	1,50	1,26-1,80	1,84	1,23	0,30	0,25-0,34	1,68	5,70
	AGO/2015	1,92	1,60-2,29	1,82	0,95	0,38	0,35-0,41	1,34	3,56
8.2	AGO/2014	1,84	1,60-2,11	1,60	0,87	0,49	0,43-0,54	1,47	3,02
	SET/2014	1,87	1,59-2,20	1,73	0,93	0,51	0,46-0,56	1,38	2,71
	OUT/2014	1,95	1,65-2,30	1,74	0,90	0,48	0,42-0,54	1,52	3,16
	NOV/2014	1,79	1,46-2,18	1,95	1,09	0,45	0,40-0,51	1,47	3,25
	DEZ/2014	1,76	1,48-2,09	1,78	1,01	0,48	0,43-0,52	1,38	2,90
	JAN/2015	1,75	1,42-2,16	2,04	1,16	0,49	0,45-0,54	1,38	2,82
	ABR/2015	1,53	1,20-1,95	2,27	1,48	0,44	0,38-0,51	1,67	3,80
	AGO/2015	1,82	1,54-2,16	1,76	0,96	0,48	0,43-0,53	1,40	2,93
8.3	AGO/2014	2,65	2,32-3,03	1,57	0,59	0,46	0,41-0,51	1,46	3,20
	SET/2014	2,42	2,00-2,93	1,91	0,79	0,40	0,36-0,46	1,53	3,78
	OUT/2014	2,60	2,18-3,11	1,83	0,70	0,49	0,43-0,55	1,51	3,10
	NOV/2014	2,46	2,01-3,01	1,99	0,81	0,46	0,41-0,52	1,46	3,16
	DEZ/2014	2,51	2,12-2,97	1,76	0,70	0,49	0,44-0,55	1,43	2,91
	JAN/2015	2,24	1,79-2,80	2,13	0,95	0,51	0,46-0,57	1,40	2,72
	ABR/2015	2,07	1,75-2,45	2,24	1,08	0,39	0,34-0,46	1,69	4,29
	AGO/2015	2,55	2,08-3,13	1,98	0,78	0,44	0,40-0,50	1,46	3,28
8.4	AGO/2014	2,47	2,19-2,78	1,49	0,60	0,42	0,37-0,47	1,48	3,52
	SET/2014	2,46	2,11-2,86	1,67	0,68	0,42	0,38-0,47	1,47	3,49
	OUT/2014	2,19	1,89-2,53	1,64	0,75	0,42	0,37-0,47	1,53	3,66
	NOV/2014	2,46	2,08-2,90	1,76	0,72	0,39	0,34-0,45	1,61	4,11
	DEZ/2014	2,52	2,21-2,87	1,55	0,61	0,46	0,43-0,49	1,27	2,77
	JAN/2015	2,25	1,82-2,77	2,02	0,90	0,41	0,37-0,45	1,39	3,40
	ABR/2015	2,32	1,88-2,87	2,04	0,88	0,46	0,40-0,52	1,57	3,41
	AGO/2015	2,38	2,01-2,81	1,76	0,74	0,40	0,36-0,44	1,39	3,47



[00215] A reprodutibilidade do primeiro período da avaliação (AGO/2014) foi comparada com os subsequentes e a determinação do índice de Kappa de Cohen encontra-se descrita na Tabela 26. Conforme representado na Tabela 27, os parâmetros de desempenho calculados variaram de acordo com as condições testadas.

[00216] Tabela 26: Concordância obtida da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração.

Condição de estresse	PROTEÍNA NATIVA							
	PRP-IBMP-8.1		PRP-IBMP-8.2		PRP-IBMP-8.3		PRP-IBMP-8.4	
	$\kappa$	IC95%	$\kappa$	IC95%	$\kappa$	IC95%	$\kappa$	IC95%
<b>SET 2014</b>	0,91	0,83-1,00	0,87	0,77-0,97	0,85	0,74-0,96	0,89	0,80-0,98
<b>OUT 2014</b>	0,91	0,83-1,00	0,85	0,74-0,96	0,83	0,71-0,94	0,91	0,83-1,00
<b>NOV 2014</b>	0,91	0,83-1,00	0,87	0,77-0,97	0,87	0,77-0,97	0,93	0,86-1,00
<b>DEZ 2014</b>	0,93	0,86-1,00	0,87	0,77-0,97	0,93	0,86-1,00	0,96	0,90-1,00
<b>JAN 2015</b>	0,85	0,74-0,96	0,78	0,66-0,91	0,85	0,74-0,96	0,85	0,74-0,96
<b>ABR 2015</b>	0,78	0,66-0,91	0,74	0,60-0,88	0,85	0,74-0,96	0,89	0,80-0,98
<b>AGO 2015</b>	0,83	0,71-0,94	0,83	0,71-0,94	0,87	0,77-0,97	0,87	0,77-0,97

[00217] Tabela 27: Parâmetros de desempenho obtidos da avaliação da estabilidade dos PRP-IBMP a um período de longa duração.

## [00218] População do estudo

PRP IBMP	Pontos de análise	AUC (IC95%)	Sen (%) (IC95%)	Esp (%) (IC95%)	Exa (%) (IC95%)	J (%)
8.1	AGO/2014	1,00	100 (92,3-100)	100 (92,3-100)	100 (96,0-100)	100
	SET/2014	0,99 (0,97-1,00)	91,3 (79,7-96,6)	100 (92,3-100)	95,7 (89,3-98,3)	91,3
	OUT-2014	0,99 (0,98-1,00)	91,3 (79,7-96,6)	100 (92,3-100)	95,7 (89,3-98,3)	91,3
	NOV/2014	0,97 (0,93-1,00)	91,3 (79,7-96,6)	100 (92,3-100)	95,7 (89,3-98,3)	91,3
	DEZ/2014	0,99 (0,99-1,00)	93,5 (82,5-97,8)	100 (92,3-100)	96,7 (90,8-98,9)	93,5
	JAN/2015	0,99 (0,98-1,00)	84,8 (71,8-92,4)	100 (92,3-100)	92,4 (85,1-96,3)	84,8
	ABR/2015	0,97 (0,93-1,00)	80,4 (66,8-89,3)	97,8 (88,7-99,6)	89,1 (81,1-94,0)	78,3
	AGO/2015	0,98 (0,96-1,00)	82,6 (69,3-90,9)	100 (92,3-100)	91,3 (83,8-95,5)	82,6
8.2	AGO/2014	1,00	100 (92,3-100)	100 (92,3-100)	100 (96,0-100)	100
	SET/2014	0,98 (0,97-1,00)	87,0 (74,3-93,9)	100 (92,3-100)	93,5 (86,5-97,0)	87,0
	OUT-2014	0,99 (0,99-1,00)	89,1 (77,0-95,3)	95,7 (85,5-98,8)	92,4 (85,1-96,3)	84,8
	NOV/2014	0,97 (0,92-1,00)	87,0 (74,3-93,9)	100 (92,3-100)	93,5 (86,5-97,0)	87,0
	DEZ/2014	0,98 (0,95-1,00)	87,0 (74,3-93,9)	100 (92,3-100)	93,5 (86,5-97,0)	87,0
	JAN/2015	0,95 (0,90-1,00)	78,3 (64,4-87,7)	100 (92,3-100)	89,1 (81,1-94,0)	78,3
	ABR/2015	0,95 (0,90-1,00)	76,1 (62,1-86,1)	97,8 (88,7-99,6)	87,0 (78,6-92,4)	73,9
	AGO/2015	0,99 (0,97-1,00)	82,6 (69,3-90,9)	100 (92,3-100)	91,3 (83,8-95,5)	82,6
8.3	AGO/2014	1,00	100 (92,3-100)	100 (92,3-100)	100 (96,0-100)	100
	SET/2014	0,96 (91,0-1,00)	87,0 (74,3-93,9)	97,8 (88,7-99,6)	92,4 (85,1-96,3)	84,8
	OUT/2014	0,96 (92,1-1,00)	87,0 (74,3-93,9)	95,7 (85,5-98,8)	91,3 (83,8-95,5)	82,6
	NOV/2014	0,97 (93,1-1,00)	87,0 (74,3-93,9)	100 (92,3-100)	93,5 (86,5-97,0)	87,0
	DEZ/2014	0,97 (93,8-1,00)	93,5 (82,5-97,8)	100 (92,3-100)	96,7 (90,8-98,9)	93,5
	JAN/2015	0,93 (86,4-0,99)	84,8 (71,8-92,4)	100 (92,3-100)	92,4 (85,1-96,3)	84,8
	ABR/2015	0,92 (85,4-0,98)	84,8 (71,8-92,4)	100 (92,3-100)	92,4 (85,1-96,3)	84,8
	AGO/2015	0,96 (91,8-1,00)	87,0 (74,3-93,9)	100 (92,3-100)	93,5 (86,5-97,0)	87,0
8.4	AGO/2014	1,00	100 (92,3-100)	100 (92,3-100)	100 (96,0-100)	100
	SET/2014	0,98 (0,96-1,00)	91,3 (79,7-96,6)	97,8 (88,7-99,6)	94,6 (87,9-97,7)	89,1
	OUT/2014	0,99 (0,98-1,00)	93,5 (82,5-97,8)	97,8 (88,7-99,6)	95,7 (89,3-98,3)	91,3
	NOV/2014	0,99 (0,99-1,00)	95,7 (85,5-98,8)	97,8 (88,7-99,6)	96,7 (90,8-98,9)	93,5
	DEZ/2014	0,99 (0,99-1,00)	95,7 (85,5-98,8)	100 (92,3-100)	97,8 (92,4-99,4)	95,7
	JAN/2015	0,96 (0,91-1,00)	87,0 (74,3-93,9)	97,8 (88,7-99,6)	92,4 (85,1-96,3)	84,8
	ABR/2015	0,97 (0,92-1,00)	89,1 (77,0-95,3)	100 (92,3-100)	94,6 (87,9-97,7)	89,1
	AGO/2015	0,98 (0,95-1,00)	89,1 (77,0-95,3)	97,8 (88,7-99,6)	93,5 (86,5-97,0)	87,0

Exemplo 10 - Dimensionamento amostral

[00219] A amostragem foi dimensionada com auxílio do programa estatístico R (*The R Project for Statistical Computing*, Viena, Áustria) para estimação de proporções, supondo-se sensibilidade de 99% e especificidade de 99%, adotando-se um erro absoluto (semi-amplitude do intervalo de confiança) de 2% e nível de confiança em 95%. Para avaliação de reações cruzadas foi utilizada a estimativa da distribuição binominal negativa, extrapolando em 5% o quantitativo de reações cruzadas possivelmente encontradas para outras doenças infecciosas.

[00220] A amostragem foi estimada em 380 amostras positivas e 380

negativas para a doença de Chagas. Para avaliação de reações cruzadas a distribuição binominal negativa estimou que, para cada 100 amostras analisadas, haveria 5% de chance de se encontrar uma reação cruzada.

#### Exemplo 11 - Obtenção dos painéis sorológicos

[00221] Foram utilizadas 1546 amostras para análise de ELISA. Para avaliação de reação cruzada foram usadas 1079 amostras de diversas doenças endêmicas no Brasil.

[00222] Amostras séricas positivas e negativas para *T. cruzi* de diferentes regiões do Brasil foram selecionadas visando sua utilização como referência para o teste em desenvolvimento e permitindo avaliar o potencial diagnóstico das proteínas recombinantes IBMP. Dessa forma, os painéis foram compostos por amostras da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná e Pernambuco, além de amostras de painéis comerciais, sendo oriundas de países das Américas Central, do Norte e do Sul.

[00223] As amostras séricas que compuseram o painel sorológico foram cedidas por Instituições parceiras e encaminhadas ao SRDC, onde foram reavaliadas para a presença ou ausência de anticorpos IgG anti-Chagas, conforme descrito na Tabela 28. As amostras negativas para Chagas e positivas para as demais doenças infecto-parasitárias foram avaliadas para verificação da possibilidade de coinfeção com a doença de Chagas. Do quantitativo de 3047 amostras recebidas, 2625 participaram do estudo e 422 (13,8%) foram excluídas por não satisfazerem os critérios de inclusão.

[00224] Tabela 28 - Painel sorológico das amostras utilizadas para avaliação do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP.

Patologia	CPqAM		HEMOPE		LACEN PE		UFG		LACEN PR		Painel AEQ		Painel Internacional		TOTAL	
	n cedido	n usado	n cedido	n usado	n cedido	n usado	n cedido	n usado	n cedido	n usado	n cedido	n usado	n cedido	n usado	n cedido	n usado
Doença de Chagas	551	519	28	27	54	50	234	193	36	36	27	24	8	8	938	857
Negativas	20	19	506	502	-	-	63	59	50	50	45	45	14	14	698	689
															<b>TOTAL</b>	<b>1636 1546</b>
Dengue			-	-	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	50	50
Esquistossomose	43	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43	42
Filariose	51	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51	51
HBC	4	4	52	49	31	27	2	2	-	-	30	30	48	48	167	160
HCV	11	10	34	32	16	16	-	-	-	-	16	16	13	13	90	87
HIV			42	40	73	68	-	-	-	-	26	26	6	6	147	140
HTLV	4	3	35	34	23	23	-	-	-	-	28	28	20	20	110	108
Leishmaniose	417	138	-	-	8	0	19	15	-	-	-	-	-	-	444	153
Leptospirose	-	-	-	-	100	92	-	-	-	-	-	-	-	-	100	92
Rubéola	-	-	-	-	18	15	-	-	-	-	-	-	-	-	18	15
Sarampo	-	-	-	-	24	21	-	-	-	-	-	-	-	-	24	21
Sífilis	-	-	115	108	-	-	-	-	-	-	30	30	-	-	145	138
HBV/HCV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	-	-	7	7
HBV/HCV/sífilis	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
HBV/HIV	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
HBV/sífilis	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
HCV/sífilis	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
HCV/HTLV/sífilis	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
HIV/sífilis	-	-	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7
HTLV/sífilis	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
															<b>TOTAL</b>	<b>1411 1079</b>
															<b>TOTAL GERAL</b>	<b>3047 2625</b>

### Exemplo 12 - Definição do padrão-ouro e caracterização do painel sorológico.

[00225] Foi realizado um estudo comparativo entre o Elisa Chagas III (BiosChile, Grupo Bios, Santiago, Chile; Lote 1F130525), o Imuno-Elisa Wama (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil; Lote 14D061), o Pathozyme® Chagas (Omega Diagnostics, Escócia, Reino Unido; Lote 7042779) e o Gold Elisa Chagas (Rem, São Paulo, Brasil; Lote CHA132A), utilizando 499 amostras negativas e 186 positivas para a doença de Chagas, sendo estas últimas provenientes de pacientes clínica e epidemiologicamente caracterizados e acompanhados pelo Ambulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) – (UPE), Brasil, as quais foram coletadas entre 2005 e 2011 e fazem parte do acervo sorológico do SRDC. Ao final desta avaliação, os dois kits que apresentaram os melhores parâmetros de desempenho foram selecionados para compor o padrão-ouro, sendo utilizados para verificação da condição sorológica do painel sorológico obtido conforme descrito no subtópico “obtenção dos painéis sorológicos”.

[00226] Além do mais, foi utilizado o teste de imunofluorescência indireta para leishmaniose humana, cedido por Biomanguinhos (FIOCRUZ-RJ, Brasil; Lote 139LH003Z), com o objetivo de verificar se as reações falso-positivas obtidas através da utilização dos PRP-IBMP ocorreram devido à reação cruzada com leishmaniose.

[00227] O estudo comparativo entre o Elisa Chagas III, o Imuno-Elisa Wama, o Pathozyme® Chagas e o Gold Elisa Chagas foi conduzido utilizando 499 amostras negativas e 186 positivas para a doença de Chagas. De acordo com a Figura 17, todos os kits foram capazes de diferenciar amostras negativas das positivas ( $p < 0,0001$ ).

[00228] As Tabelas 29 e 30 trazem, respectivamente, a avaliação dos parâmetros de desempenho e os valores médios dos IR.

[00229] Tabela 29: Parâmetros de desempenho de quatro kits comerciais para definição do padrão-ouro

PAR	Elisa Chagas III		Imuno-Elisa Chagas		Gold Elisa Chagas		Pathozyme® Chagas	
	%	IC95%	%	(IC95%)	%	IC95%	%	IC95%
Sen	97,3	93,8-98,8	99,5	97,0-99,9	100	98,0-100	99,5	97,0-99,9
Esp	100	99,2-100	99,2	98,0-99,7	100	99,2-100	97,0	95,1-98,2
Exa	99,0	97,9-99,5	99,3	98,3-99,7	100	99,4-100	97,7	96,2-98,6
J	96,9	-	98,7	-	100	-	96,5	-
$\kappa$	97,4	95,5-99,3	98,2	96,6-99,8	100	-	94,2	91,4-97,0

[00230] Tabela 30: Índices de reatividade de quatro kits comerciais para definição do padrão-ouro

Kits comerciais	AMOSTRAS POSITIVAS				AMOSTRAS NEGATIVAS			
	IR	IC95%	$\sigma$	CV	IR	IC95%	$\sigma$	CV
<b>Elisa Chagas III</b>	2,94	2,76-3,12	1,54	0,33	0,29	0,28-0,30	1,29	0,27
<b>Imuno-Elisa Chagas</b>	2,21	2,14-2,28	1,25	0,20	0,21	0,20-0,22	1,64	0,67
<b>Gold Elisa Chagas</b>	5,95	5,62-6,28	1,46	0,32	0,27	0,26-0,27	1,16	0,17
<b>Pathozyme® Chagas</b>	2,39	2,30-2,48	1,30	0,25	0,31	0,29-0,33	1,72	0,71

### Exemplo 13 - Avaliação do potencial diagnóstico dos PRP-IBMP

[00231] Estudo de fase I

[00232] O objetivo deste estudo foi determinar a capacidade que os PRP-IBMP possuem em discriminar amostras positivas das negativas. Para tal, foram utilizadas 280 amostras séricas positivas e 20 negativas para a doença de Chagas. As reações de ELISA foram realizadas como descrito no subtópico “padronização dos componentes do ELISA indireto”. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenho foram determinados para cada um dos antígenos.

[00233] A avaliação sorológica utilizando 280 amostras séricas positivas e 20 negativas para a doença de Chagas mostrou áreas abaixo da curva (AUC) de 99,64%, 99,43%, 98,39% e 99,98% para os PRP-IBMP-8.1, 8.2, 8.3 e 8.4, respectivamente. Conforme a Tabela 31, a avaliação da sensibilidade e especificidade exibiu valores acima de 95% e 90%, respectivamente, para os PRP-IBMP.

[00234] Tabela 31: Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na fase I do estudo

PAR	PRP-IBMP-8.1		PRP-IBMP-8.2		PRP-IBMP-8.3		PRP-IBMP-8.4	
	%	IC95%	%	IC95%	%	IC95%	%	IC95%
<b>AUC</b>	99,64	98,94-100	99,43	98,74-100	98,39	96,39-100	99,86	99,92-100
<b>Sen</b>	98,93	96,90-99,63	98,21	95,89-99,23	95,36	92,22-97,27	99,64	98,01-99,94
<b>Esp</b>	100	83,89-100	90,00	69,90-97,21	95,00	76,39-99,11	100	83,89-100
<b>PFN</b>	1,07	0,37-3,10	1,79	0,77-4,11	4,64	2,73-7,78	0,36	0,06-1,99
<b>PFP</b>	0,0	-	10,00	2,79-30,10	5,00	0,89-23,61	0,0	-
<b>ET</b>	1,00	0,34-2,90	2,33	1,13-4,74	4,67	2,80-7,68	0,33	0,06-1,86
<b>Exa</b>	99,00	97,10-99,66	97,67	95,26-98,87	95,33	92,32-97,20	99,67	98,14-99,94
<b>J</b>	98,93	-	88,21	-	90,36	-	99,64	-

[00235] Os valores médios dos IR estão discriminados por molécula na Tabela 32. A análise gráfica dos dados pode ser verificada na Figura 18.

[00236] Tabela 32: Índice de reatividade dos PRP-IBMP na fase I do estudo.

PRP- IBMP	AMOSTRAS POSITIVAS				AMOSTRAS NEGATIVAS			
	IR	IC95%	$\sigma$	CV	IR	IC95%	$\sigma$	CV
8.1	6,01	5,68-6,36	1,62	0,27	0,48	0,43-0,54	1,28	2,66
8.2	5,26	4,93-5,61	1,75	0,33	0,65	0,55-0,76	1,40	2,16
8.3	4,96	4,59-5,37	1,96	0,40	0,59	0,46-0,74	1,66	2,83
8.4	5,93	5,64-6,23	1,53	0,26	0,50	0,43-0,57	1,37	2,76

[00237] Estudo de fase II

[00238] O estudo de fase II foi realizado com a finalidade de avaliar o potencial diagnóstico dos PRP-IBMP. Com esta finalidade, foram utilizadas 857 amostras séricas positivas e 689 negativas para a doença de Chagas. As amostras foram avaliadas conjuntamente e subdivididas nas regiões geográficas das quais foram oriundas, a saber: Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná e Pernambuco, além da utilização de painéis comerciais. As reações de ELISA foram realizadas como descrito no subtópico “padronização dos componentes do ELISA indireto”. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenhos foram determinados para cada um dos antígenos. Os valores de IR e dos parâmetros de desempenho e de IR foram comparados entre as moléculas a fim de verificar possível capacidade diagnóstica.

[00239] A avaliação sorológica dos PRP-IBMP foi realizada utilizando o painel sorológico descrito na Tabela 28, ou seja, 857 amostras positivas para a doença de Chagas e 689 negativas. Os parâmetros de desempenho estimados para os quatro PRP-IBMP encontram-se descritos na Tabela 33 e os valores médios dos IR estão discriminados por molécula na Tabela 34. As análises gráficas dos IR estão representadas na Figura 19.

[00240] Tabela 33: Parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP na fase II do estudo

PAR	PRP-IBMP-8.1		PRP-IBMP-8.2		PRP-IBMP-8.3		PRP-IBMP-8.4	
	%	IC95%	%	IC95%	%	IC95%	%	IC95%
AUC	99,77	99,53-100	99,85	99,76-99,94	99,90	99,81-99,99	99,99	99,98-100
Sen	97,43	96,14-98,30	94,28	92,52-95,65	97,90	96,70-98,67	99,30	98,48-99,68
Esp	99,42	98,52-99,77	99,56	98,73-99,85	99,85	99,18-99,97	100	99,45-100
PFN	2,57	1,70-3,86	5,72	4,35-7,48	2,10	1,33-3,30	0,70	0,32-1,52
PFP	0,58	0,23-1,48	0,44	0,15-1,27	0,15	0,03-0,82	0,00	-
ET	1,68	1,15-2,45	3,36	2,57-4,38	1,23	0,79-1,91	0,39	0,18-0,84
Exa	98,32	97,55-98,85	96,64	95,62-97,43	98,77	98,09-99,21	99,61	99,16-99,82
J	96,85	-	93,85	-	97,75	-	99,30	-
RV+	168	63-446	217	70-670	674	95-4782	1986*	70-56087
RV-	0,026	0,017-0,039	0,057	0,044-0,075	0,021	0,013-0,033	0,007	0,003-0,016

[00241] Tabela 34: Índice de reatividade dos PRP-IBMP na fase II do estudo

PRP-IBMP	AMOSTRAS POSITIVAS				AMOSTRAS NEGATIVAS			
	IR	IC95%	$\sigma$	CV	IR	IC95%	$\sigma$	CV
8.1	2,84	2,74-2,94	1,68	0,59	0,28	0,27-0,29	1,60	5,67
8.2	2,15	2,08-2,23	1,68	0,78	0,33	0,32-0,34	1,50	4,55
8.3	2,54	2,46-2,62	1,56	0,62	0,23	0,22-0,24	1,73	7,51
8.4	2,58	2,52-2,64	1,45	0,56	0,20	0,19-0,21	1,77	8,92

[00242] A análise das quatro moléculas utilizando os IR médios das amostras negativas mostrou não haver sobreposição dos IC95% dentre elas. Além do mais, a avaliação estatística revelou diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ) (Figura 20A). Resultados semelhantes foram encontrados para as amostras positivas, com exceção para as moléculas IBMP-8.3 e IBMP-8.4 ( $p=0,4160$ ) (Figura 20B). Ademais, também foi avaliada a sobreposição dos IC95% para os valores de sensibilidade e especificidade. Dentre os IC95% analisados, a sensibilidade do PRP-IBMP-8.2 apresentou o menor IC95%, não se sobrepondo com aquele calculado para as demais moléculas. Não foi também observada sobreposição entre o IC95% dos PRP-IBMP-8.1 e 8.4 (Figura 21). Quanto à especificidade foi demonstrada sobreposição entre os IC95% para todas as moléculas (Figura 21).

[00243] A correlação entre os resultados obtidos para cada um dos PRP foi avaliada pelo método de Spearman, mostrando resultados acima de 0,81 para todas as possibilidades testadas, como resumido na Tabela 35.

[00244] Tabela 35: Correlação entre os PRP-IBMP na fase II do estudo

PRP-IBMP	8.2		8.3		8.4	
	r	IC95%	r	IC95%	r	IC95%
8.1	0,87	(0,86-0,88)	0,81	(0,80-0,83)	0,87	(0,86-0,89)
8.2	-	-	0,84	(0,83-0,86)	0,87	(0,86-0,88)
8.3	-	-	-	-	0,85	(0,83-0,86)

[00245] Conforme descrito na Tabela 36, os IR estratificados por



origem região geográfica foram descritos com objetivo de verificação da magnitude de resposta aos antígenos PRP-IBMP por indivíduos infectados provenientes de diferentes localidades do Brasil e de alguns países da América Latina e Estados Unidos (painéis internacionais). A análise gráfica destes dados encontra-se disposta nas Figuras 22 e 23.

[00246] Tabela 36: Parâmetros de desempenho do PRP-IBM estratificados por origem ou região geográfica na fase II do estudo

	PRP IBMP	AUC (IC95%)	Sen (%) (IC95%)	Esp (%) (IC95%)	Exa (%) (IC95%)	J (%)
BA	8.1	0,99 (0,98-1,00)	98,5 (91,8-99,7)	94,7 (75,4-99,1)	97,6 (91,7-99,3)	93,2
	8.2	0,99 (0,99-1,00)	93,8 (85,2-97,6)	100 (83,2-100)	95,2 (88,4-98,1)	93,8
	8.3	1,00	100 (94,4-100)	100 (83,2-100)	100 (95,6-100)	100
	8.4	0,99 (0,99-1,00)	98,5 (91,8-99,7)	100 (83,2-100)	98,8 (93,6-99,8)	98,5
GO	8.1	0,99 (0,99-1,00)	97,1 (90,2-99,2)	95,2 (77,3-99,2)	96,7 (90,8-98,9)	92,4
	8.2	0,99 (0,99-1,00)	98,6 (92,3-99,7)	95,2 (77,3-99,2)	97,8 (92,3-99,4)	93,8
	8.3	0,99 (0,99-1,00)	97,1 (90,2-99,2)	100 (84,5-100)	97,8 (92,3-99,4)	97,1
	8.4	1,00	100 (94,8-100)	100 (84,5-100)	100 (95,9-100)	100
MG	8.1	0,94 (0,86-1,00)	94,8 (85,9-98,2)	94,7 (75,4-99,1)	94,8 (87,4-98,0)	89,6
	8.2	0,99 (0,99-1,00)	94,8 (85,9-98,2)	94,7 (75,4-99,1)	94,8 (87,4-98,0)	89,6
	8.3	0,99 (0,99-1,00)	93,1 (83,6-97,3)	100 (83,2-100)	94,8 (87,4-98,0)	93,1
	8.4	1,00	100 (93,8-100)	100 (83,2-100)	100 (95,2-100)	100
PAINEL	8.1	1,00	93,8 (79,9-98,3)	100 (93,9-100)	97,8 (92,3-99,4)	93,8
	8.2	0,99 (0,99-1,00)	84,4 (68,2-93,1)	100 (93,9-100)	94,5 (87,8-97,6)	84,4
	8.3	1,00	100 (89,3-100)	100 (93,9-100)	100 (95,9-100)	100
	8.4	1,00	100 (89,3-100)	100 (93,9-100)	100 (95,9-100)	100
PR	8.1	0,99 (0,99-1,00)	97,2 (85,8-99,5)	100 (92,9-100)	98,8 (93,7-99,8)	97,2
	8.2	0,99 (0,99-1,00)	97,2 (85,8-99,5)	100 (92,9-100)	98,8 (93,7-99,8)	97,2
	8.3	1,00	100 (90,4-100)	100 (92,9-100)	100 (95,7-100)	100
	8.4	1,00	100 (90,4-100)	100 (92,9-100)	100 (95,7-100)	100
PE	8.1	0,99 (0,99-1,00)	97,8 (96,3-98,7)	99,8 (98,9-100)	98,7 (97,9-99,3)	97,6
	8.2	0,99 (0,99-1,00)	94,1 (91,9-95,7)	99,8 (98,9-100)	96,8 (95,6-97,7)	93,9
	8.3	0,99 (0,99-1,00)	98,0 (96,5-98,8)	99,8 (98,9-100)	98,8 (98,0-99,3)	97,8
	8.4	0,99 (0,99-1,00)	99,2 (98,1-99,6)	100 (99,3-100)	99,6 (99,0-99,8)	99,2

#### Exemplo 14 - Reações cruzadas

[00247] A investigação de possíveis reações cruzadas foi conduzida através da utilização de amostras séricas de indivíduos portadores de doenças infecto-parasitárias, são elas: dengue, esquistossomose, filariose, hepatite B,

hepatite C, HIV, HTLV, leishmaniose, leptospirose, rubéola, sarampo e sífilis; porém negativas para a doença de Chagas. As reações de ELISA foram realizadas como descrito no tópico Padronização dos componentes do ELISA indireto e as médias geométricas dos IR e os parâmetros de desempenho foram determinados para cada um dos antígenos.

[00248] A avaliação gráfica das reações cruzadas está descrita na Figura 24. Os pontos em vermelho representam as reações cruzadas utilizando os PRP-IBMP. Desta maneira, das 1079 amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias, foi observada reatividade para 0,46% (5/1079) para o PRP-IBMP-8.1 (leptospirose: 2; HTLV: 1; leishmaniose: 2) (Figura 22A), 0,85% (8/1079) para o PRP-IBMP-8.2 (leptospirose: 2; sífilis: 2; HCV: 1; HIV: 1; HTLV: 1 e esquistossomose: 1) (Figura 22B), 0,46% (5/1079) para o PRP-IBMP-8.3 (HIV: 1; HTLV: 1; sífilis: 1; leishmaniose: 1 e esquistossomose: 1) (Figura 22C) e 0,37% (4/1079) para o PRP-IBMP-8.4 (HIV:1, HTLV: 1, leishmaniose: 1 e sífilis: 1) (Figura 23D). Ao considerar a faixa do CO  $\pm$  10% como a zona cinza foi observado que 0,74% (8/1079) das amostras apresentaram resultados inconclusivos para o PRP-IBMP-8.1, 1,01% (11/1079) para o PRP-IBMP-8.2, 0,28% (3/1079) para o PRP-IBMP-8.3 e 0,37% (4/1079) para o PRP-IBMP-8.4. Esta condição encontra-se representada na Figura 24 com o símbolo de estrela.

#### Exemplo 15 - Concordância de desempenho com kits comerciais

[00249] Para avaliar a concordância das proteínas recombinantes IBMP 8-1 a 8-4 com kits comerciais foram testadas 688 amostras negativas e 854 positivas para a doença de Chagas, em paralelo com o Gold Elisa Chagas lote CHA132A (REM Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) e o Pathozyme® Chagas lote 7042779 (Omega Diagnostics, Escócia, Reino Unido). Ademais, foram também avaliadas 932 amostras negativas para a doença de Chagas, porém positivas para dengue (n=50), esquistossomose

(n=42), filariose (n=51), hepatite B (n=158), hepatite C (n=84), HIV (n=140), HTLV (n=108), leishmaniose (n=16), leptospirose (n=90), rubéola (n=13), sarampo (n=20), sífilis (n=138) e 22 de co-infecções, a saber: HIV e sífilis (n=7), hepatite B e sífilis (n=2), hepatite C e sífilis (n=2), HTLV e sífilis (n=1), HIV e hepatite B (n=1), hepatite B e hepatite C (n=7), hepatite C, hepatite B e sífilis (n=1) e hepatite C, HTLV e sífilis (n=1). As reações de ELISA foram realizadas de acordo com as recomendações dos fabricantes. Ao final das reações os resultados foram normalizados com objetivo de torná-los comparáveis quantitativamente àqueles obtidos para as proteínas recombinantes. As médias geométricas dos IR bem como os parâmetros de desempenhos foram determinados e os resultados comparados ao das proteínas recombinantes.

[00250] Como demonstrado na Tabela 37, a avaliação do painel sorológico utilizando os kits comerciais Gold Elisa Chagas e o Pathozyme® Chagas mostrou sensibilidade de 98,9% e 98,4%, e especificidade de 99,7%, e 96,7%, respectivamente. Demais parâmetros de desempenho podem ser visualizados diretamente na mesma Tabela.

[00251] Tabela 37: Comparação dos parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP com kits comerciais

Teste	Sen (%) (IC95%)	Esp (%) (IC95%)	Exa (%) (IC95%)	Erro (%) (IC95%)	J (%)	RV+	RV-
8.1	98,7 (97,7-99,3)	99,4 (98,5-99,8)	99,0 (98,4-99,4)	1,0 (0,6-1,6)	98,1	167,8 (63,1-445,8)	0,025 (0,016-0,038)
8.2	94,3 (92,5-95,6)	99,6 (98,7-99,9)	96,6 (95,6-97,4)	3,4 (2,6-4,4)	93,8	216,2 (69,9-688,7)	0,058 (0,044-0,076)
8.3	97,9 (96,7-98,7)	99,9 (99,2-100)	98,8 (98,1-99,2)	1,2 (0,8-1,9)	97,7	673,5 (95,0-4774,7)	0,021 (0,013-0,033)
8.4	99,3 (98,5-99,7)	100 (99,4-100)	99,6 (99,2-99,8)	0,4 (0,2-0,8)	99,3	1985,0 (70,3-56064,3)	0,007 (0,003-0,016)
Gold	98,9 (98,0-99,4)	99,7 (98,9-99,9)	99,3 (98,7-99,6)	0,7 (0,4-1,3)	98,7	340,4 (85,3-1358,3)	0,011 (0,006-0,020)
Patho	98,4 (97,3-99,0)	96,7 (95,0-97,8)	97,6 (96,7-98,3)	2,4 (1,7-3,3)	95,0	29,42 (19,7-44,0)	0,017 (0,010-0,029)

[00252] Os valores médios dos IR relativos ao Gold Elisa Chagas e ao

Pathozyme® Chagas para as amostras positivas e negativas são exibidos na Tabela 38. As análises gráficas e a avaliação da significância estatística entre os grupos podem ser visualizadas na Figura 28.

[00253] Tabela 38: Comparação dos índices de reatividade dos PRP-IBMP com kits comerciais

Condições de análise	AMOSTRAS POSITIVAS				AMOSTRAS NEGATIVAS			
	IR	IC95%	$\sigma$	CV	IR	IC95%	$\sigma$	CV
<b>PRP-IBMP-8.1</b>	2,85	2,75-2,95]	1,68	0,59	0,28	0,27-0,29	1,59	5,66
<b>PRP-IBMP-8.2</b>	2,15	2,07-2,22	1,68	0,78	0,33	0,32-0,34	1,50	4,55
<b>PRP-IBMP-8.3</b>	2,54	2,47-2,62	1,56	0,61	0,23	0,22-0,24	1,73	7,49
<b>PRP-IBMP-8.4</b>	2,58	2,52-2,65	1,45	0,56	0,20	0,19-0,21	1,77	8,92
<b>Gold Elisa Chagas</b>	5,15	4,97-5,33	1,67	0,32	0,27	0,26-0,28	1,24	4,51
<b>Pathozyme® Chagas</b>	2,30	2,24-2,35	1,43	0,62	0,30	0,29-0,31	1,74	5,76

[00254] A análise da correlação de Spearman entre os resultados obtidos pelos kits comerciais com aqueles obtidos pelos PRP-IBMP mostrou valores acima de 0,80 para todas as possibilidades de análise (Tabela 39). Entre os kits a correlação determinada foi de 0,82 (IC95%: 0,80-0,84).

[00255] Tabela 39 - Análise da correlação entre os PRP-IBMP com kits comerciais

PRP IBMP	Gold Elisa Chagas		Pathozyme® Chagas	
	r	IC95%	r	IC95%
<b>8.1</b>	0,81	(0,79-0,82)	0,80	(0,78-0,81)
<b>8.2</b>	0,83	(0,81-0,84)	0,81	(0,80-0,83)
<b>8.3</b>	0,86	(0,84-0,87)	0,84	(0,82-0,85)
<b>8.4</b>	0,84	(0,83-0,86)	0,84	(0,82-0,85)

[00256] A Figura 29 apresenta um gráfico de sensibilidade versus especificidade no qual podem ser visualizados os parâmetros de desempenho dos PRP-IBMP e dos kits comerciais Gold Elisa Chagas e Pathozyme® Chagas.

[00257] Das 932 amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infectoparasitárias 0,43% (4/932) apresentou reatividade para a doença de Chagas (sífilis: 2; HTLV: 1; leptospirose: 1) no kit Gold Elisa

Chagas (Figura 30A). Para o Pathozyme® Chagas 0,21% (2/932) das amostras foi reativa para Chagas (HTLV: 2). No entanto, o Gold Elisa Chagas forneceu somente 0,12% (1/932) de resultado inconclusivo (leishmaniose: 1), enquanto que o Pathozyme® Chagas forneceu 1,50% (14/932) de resultado nesta condição (co-infecção HIV/HBV: 1; dengue: 1; HCV: 4; HIV: 1; HTLV: 3; rubéola: 1; esquistossomose: 1; sífilis: 3) (Figura 30B). Os valores dos IR médios para ambos os kits estão descritos na Tabela 40.

[00258] Tabela 40: Índices de reatividade dos PRP-IBMP utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias

Morbidades	Gold Elisa Chagas				Pathozyme® Chagas			
	IR	IC95%	$\sigma$	CV	IR	IC95%	$\sigma$	CV
Co-infecções	0,31	0,30-0,33	1,10	3,35	0,38	0,31-0,48	1,66	4,32
Dengue	0,35	0,34-0,37	1,116	3,27	0,27	0,24-0,32	1,65	6,03
Esquistossomose	0,33	0,32-0,34	1,14	3,44	0,30	0,25-0,35	1,73	5,78
Filariose	0,33	0,32-0,34	1,12	3,44	0,29	0,26-0,33	1,54	5,25
HBV	0,30	0,29-0,31	1,22	4,08	0,28	0,26-0,30	1,53	5,44
HCV	0,33	0,31-0,34	1,21	3,70	0,34	0,31-0,38	1,62	4,74
HIV	0,31	0,30-0,33	1,29	4,11	0,30	0,28-0,32	1,52	5,09
HTLV	0,29	0,28-0,31	1,27	4,33	0,31	0,28-0,34	1,71	5,62
Leishmaniose	0,38	0,31-0,47	1,51	3,94	0,18	0,14-0,23	1,60	8,96
Leptospirose	0,32	0,30-0,33	1,26	4,00	0,27	0,25-0,29	1,52	5,68
Rubéola	0,28	0,26-0,30	1,15	4,14	0,21	0,15-0,30	1,81	8,54
Sarampo	0,29	0,27-0,30	1,15	4,03	0,25	0,21-0,30	1,49	6,01
Sífilis	0,35	0,34-0,36	1,26	3,60	0,31	0,28-0,33	1,64	5,36

### Exemplo 16 - Análise dos resultados inconclusivos

[00259] Do total de amostras séricas positivas para a doença de Chagas cedidas pelas Instituições parceiras, 81 (8,6%) (Tabela 28) apresentaram resultados discordantes quando submetidas à análise dos testes usados como padrão-ouro neste estudo. As análises utilizando os PRP-IBMP isoladamente ou em diferentes combinações (interseções de conjuntos) encontram-se descritas na Figura 31.

### **Microarranjo líquido:**

### Exemplo 17 - Acoplamento das proteínas IBMP com microesferas e

procedimento LMA

[00260] Os antígenos foram acoplados sob diferentes condições de pH do tampão e concentração de antígenos: IBMP-8.1 em PBS pH 7.4 em 66 µg / mL, IBMP-8.2 em PBS pH 7,4 a 80,3 µg/mL, IBMP-8.3 em PBS pH 7,2 a 70 µg/mL e IBMP-8.4 em PBS pH 7,0 a 70 µg/mL. Estas condições correspondem ao maior sinal ao ruído proporções e a melhor curva de ROC depois de testá-los contra amostras de soro positivo e negativo. O acoplamento das proteínas IBMP em microesferas carboxiladas paramagnéticas (Luminex Corp, Austin-TX, EUA) foi realizado usando o protocolo do fabricante. Em resumo, uma suspensão de  $2 \times 10^6$  microesferas foram misturadas em banho de ultrassom (*Cole-Parmer ultrasonic cleaner, Cole-Parmer Instruments Company, Vernon Hills-IL, USA*) e agitação horizontal (*IKA vortex genius 3 VG3S32, IKA do Brasil, Campinas-SP, Brasil*) para assegurar a distribuição homogênea da suspensão. Após duas lavagens, as microesferas foram suspensas em 400 µl de tampão de ativação (100 mM de fosfato de sódio, pH 6,3). Soluções (50 µL de cada) de N-hidroxissulfosuccinimida (Pierce, Rockford-IL, EUA) e cloridrato de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (Pierce), ambos diluídos para 50 mg/mL em água de duplamente destilada (dH<sub>2</sub>O), foram adicionados para ativar as microesferas quimicamente. Após a mistura, as microesferas foram incubadas durante 20 minutos no escuro a 25°C a uma agitação lateral de 250 rpm. As microesferas ativadas foram posteriormente lavadas duas vezes com tampão de acoplamento, após a diluição de 200 µl de antígeno no tampão de acoplamento na concentração escolhida. Estas suspensões foram incubadas a 250 rpm agitação horizontal durante 2 horas a 37°C. Após a incubação, as microesferas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS, contendo 1% de BSA, 0,05% de Tween 20). As suspensões finais de microesferas foram contadas (Beckman Coulter Z3, Kendall-FL, EUA) e ajustadas para uma concentração de  $4 \times 10^4$  microesferas/mL em tampão de

armazenamento (PBS contendo 1% de BSA e 0,02% de azida de sódio) e armazenado, protegidas da luz a 2-8°C em tubos de baixa ligação (# 0030 108.116, Eppendorf, Ham- Burg, Alemanha) por 24 horas. Os imunoenaios de microarranjo líquido foram realizados utilizando amostras de soro diluído para 1: 200 em tampão de ensaio (PBS contendo 1% de BSA, Tween 20 a 0,05%). 50 mL de micro suspensão de esfera (~ 2.500) e 50 µL de soro diluído foram misturados em cada poço de uma placa de 96 poços placa e incubada durante 15 minutos no escuro a 37°C com rotação horizontal a 600 rpm. As microesferas foram então lavadas duas vezes com 100 µL de tampão de lavagem em placa Hydroflex com suporte de placa magnética (TECAN, Durham-NC, EUA). IgG anti-humana de cabra conjugada a ficoeritrina (GTIG-001, substratos de musgo, Pasadena-MD, EUA) diluído 1: 1000 em tampão de ensaio foi adicionado e as microesferas foram incubadas durante 15 minutos no escuro a 37°C com rotação horizontal a 600 rpm. As microesferas foram lavadas duas vezes com 200 µL de tampão de lavagem e uma vez com Sheath Fluid 1x (Luminex Corp, Austin-TX, EUA). Os resultados, expressos como intensidade mediana de fluorescência (MFI), foi determinada com um dispositivo Luminex 200.

#### Exemplo 18 - Avaliação das proteínas recombinantes em ELISA e Microarranjo líquido

[00261] Soros de 300 indivíduos que vivem em uma área endêmica para doença de Chagas previamente testados para infecção por *T. cruzi* usando dois testes, conforme recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil, foram testados por testes de detecção de antígeno-anticorpo usando quatro proteínas quiméricas recombinantes.

[00262] Com base no número total de amostras, a área sob a curva (AUC) para proteínas IBMP variou de 0,9839 a 0,9998 (p <0,0001) como detectado por ELISA e de 0,9784 a 0,9971 (p <0,0001) por microarranjo líquido, demonstrando alta precisão diagnóstica para todas as proteínas

quiméricas recombinantes de IBMP (Figuras 32 e 33). Nas análises ELISA, o escore de sensibilidade apresentou valores de até 98% para IBMP-8.1, -8.2 e -8.4 proteínas e até 95% para IBMP-8.3. A análise global de negativos amostras de soro revelaram que os valores negativos mais baixos e mais altos foram apresentados pelo IBMP-8.2 (90%) e pelos antígenos IBMP-8.1 e -8.4 (100%). Com IC 95%, os dados de sensibilidade e especificidade não mostraram diferença entre os antígenos. Para amostras positivas, as proteínas 8.1 e -8.4 apresentaram RI mais elevado seguido de IBMP-8.2 e -8.3. Diferenças significantes foram evidenciados entre amostras positivas e negativas considerando a análise RI ( $p < 0,0001$ ).

[00263] Resultados semelhantes foram obtidos no microarranjo líquido (Fig. 33). Com essa metodologia, a sensibilidade variou de 98,6% (IBMP-8.1 e -8.2) para 100% (IBMP-8.4) e especificidade de 90% (IBMP-8.1) para 100% (IBMP-8.3). O RI mais alto foi alcançado pelo IBMP-8.3, seguido pelo IBMP-8.2, -8.4, e -8.1. Não houve diferença significativa nos parâmetros de desempenho quando os antígenos foram avaliados pelas metodologias ELISA e microarranjo líquido, exceto a sensibilidade IBMP-8.3.

[00264] O acordo entre os resultados esperados fornecidos por antígenos quiméricos de *T. cruzi* variou de 95,3% para IBMP-8.3 a 99,7% para IBMP-8.4 em amostras avaliadas por ELISA e 98,0% para IBMP-8.1 e 99,7% para IBMP-8.4 por microarranjo líquido. O alto índice de Cohen Kappa ( $\kappa > 0,81$ ) de IBMP-8.1, -8.2 e -8.4 por ELISA e de IBMP-8.1 a -8.4 pela LMA sublinham excelente acordo de resultados de teste, que mostrou concordância quase perfeita com os testes de referência. O IBMP-8.3 em amostras avaliadas por ELISA proporcionou 14 resultados discordantes, revelando substancial acordo ( $\kappa = 0,71$ ) com testes de referência.

[00265] É evidente que os exemplos acima foram apresentados apenas em caráter ilustrativo, e que modificações e variações dos mesmos, óbvias para os técnicos no assunto, são consideradas como inclusas no escopo da



presente invenção.

[00266] As reivindicações a seguir não pretendem, de modo algum, serem limitadoras do escopo da presente invenção. Várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e do escopo da presente invenção.

## REFERÊNCIAS

Os documentos citados são incorporados aqui por referência em sua totalidade.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 38, supl. 3, p. 7-29, 2005.

CAMUSSONE, C. et al. Comparison of recombinant T. cruzi peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. Clin. And Vaccine Immunol, v. 16, n.6, p. 899-905, 2009.

CORDERO, E. M. et al. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of Trypanosoma cruzi. Journal of Proteome Research, Washington, v. 8, n. 7, p. 3642-3652, July 2009.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature, London, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, June 2010.

DA SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Trends in Parasitology, Oxford, v. 17, n. 6, p. 286-291, June 2001.

FRASCH, A. C. et al. Comparison of genes encoding Trypanosoma cruzi antigens. Parasitology Today, Amsterdam, v. 7, n. 6, p. 148-151, June 1991.

GOMES, Y. M. PCR and Sero-diagnosis of Chronic Chagas' disease. Biotechnological advances. Appl. Biochem. Biotech, v.66,p.119. 1997.

GOMES, Y. M. et al. Emprego do kit EIE-Recombinante-Chagas-Bio-Manguinhos no diagnóstico da doença de Chagas crônica. Salud y Ciencia,

v.1,p. 1- 10, 2004.

GOMES, Y. M., LORENA, V. M.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 115-121, jul. 2009.

HERNÁNDEZ, P. et al. Highly effective serodiagnosis for chagas' disease. Clin. And Vaccine Immunology, p. 1589-1603, 2010. HOTEZ, P. J. et al., Chagas Disease: "The New HIV/AIDS of the Americas". PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e1498, May 2012.

HOUGHTON, R.L. et al. Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to T. cruzi in patients with treated or untreated Chagas' disease. J. Infect. Disease, v. 181, p. 325-330, 2000.

HOUGHTON, R.L. et al. Lateral Flow Immunoassay for Diagnosis of Trypanosoma cruzi Infection with High Correlation to the Radioimmunoprecipitation Assay. Clin. And Vaccine Immunology, v.16, No. 4, p. 515-520, Apr. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. The Weekly Epidemiological Record, Geneva, v. 90, n. 6, p. 33-43, Feb. 2015.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. Chagas in the Americas for Public Health Workers. Washington, 10 jul. 2014. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743) . Acesso em: 22 out. 2015.

PAN, A. A. et al. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to Trypanosoma cruzi (Chagas' disease). The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 165, n. 3, p. 585-588, Mar. 1992.

SANTOS, L. et al. In-house ELISA method to analyze anti-Trypanosoma

cruzi IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 45, n. 1, p. 35-44, fev. 2012.

TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biology and Disease*, London, v. 2, n. 1, p. 12, Oct. 2003.

VERISSIMO DA COSTA, G. C. et al. The identification and characterization of epitopes in the 30-34kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of chagasic patients. *Journal of Proteomics*, Amsterdam, v. 80, p. 34-42, Mar. 2013.

## REIVINDICAÇÕES

1. Proteína recombinante ou sintética, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um fragmento de uma ou mais proteínas selecionadas do grupo de: fragmento do vetor, antígeno de superfície 2, trans-sialidase, proteína L19 de subunidade ribossomal 60S, calpaína cisteína peptidase, proteína de antígeno repetitivo flagelar, proteína associada ao microtúbulo de *Trypanosoma cruzi*, proteína de membrana citoplasmática, e opcionalmente ligadores ou espaçadores, em que um ou mais aminoácidos são opcionalmente substituídos, adicionados ou deletados em relação à sequência natural.

2. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais fragmentos de cada uma das proteínas selecionadas dentre: fragmento do vetor da SEQ ID NO:1, antígeno de superfície 2 da SEQ ID NO: 2, trans-sialidase da SEQ ID NO: 3, proteína L19 de subunidade ribossomal 60S da SEQ ID NO: 4 e trans-sialidase da SEQ ID NO: 5.

3. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que compreende ainda pelo menos um ligador ou espaçador entre os referidos fragmentos.

4. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que compreende os fragmentos selecionados do grupo: aminoácidos 1 a 34 da SEQ ID NO: 1, os aminoácidos 288 a 333 da SEQ ID NO: 2, aminoácidos 1000 a 1013 da SEQ ID NO: 3, aminoácidos 218 a 234 da SEQ ID NO: 4 e 724-743 da SEQ ID NO:5.

5. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que é apresentada pela SEQ ID NO: 21 ou uma sequência com 90% de identidade com a SEQ ID NO: 21.

6. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a

reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais fragmentos de cada uma das proteínas selecionadas dentre: fragmento do vetor da SEQ ID NO: 1, calpaína cisteína peptidase da SEQ ID NO: 6, trans-sialidase da SEQ ID NO: 7, trans-sialidase da SEQ ID NO: 8, antígeno de superfície 2 de SEQ ID NO: 9.

7. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que compreende ainda pelo menos um ligador entre os referidos fragmentos.

8. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que compreende os aminoácidos 1 a 34 da SEQ ID NO: 1, aminoácidos 31 a 97 da SEQ ID NO: 6, aminoácidos 658 a 669 da SEQ ID NO: 7, aminoácidos 283 a 343 da SEQ ID NO: 8 e aminoácidos 166 a 231 da SEQ ID NO: 9.

9. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que é apresentada pela SEQ ID NO: 22 ou uma sequência com 90% de identidade com a SEQ ID NO: 22.

10. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais fragmentos de cada uma das proteínas selecionadas dentre: antígeno de superfície 2 de SEQ ID NO: 10, proteína de antígeno repetitivo flagelar de SEQ ID NO: 11, trans-sialidase de SEQ ID NO: 12, proteína L19 de subunidade ribossomal 60S de SEQ ID NO: 13 e fragmento do vetor de SEQ ID NO: 14.

11. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que compreende ainda pelo menos um ligador entre os referidos fragmentos.

12. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que compreende os aminoácidos 566 a 602 da SEQ ID NO: 10, os aminoácidos 2 a 44 da SEQ ID

NO: 11, aminoácidos 507 a 551 da SEQ ID NO: 12, aminoácidos 236-284 da SEQ ID NO: 13 e aminoácidos 1 a 17 da SEQ ID NO: 14.

13. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que é apresentada pela SEQ ID NO: 23 ou uma sequência com 90% de identidade com a SEQ ID NO: 23.

14. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais fragmentos de cada uma das proteínas selecionadas dentre: antígeno de superfície 2 de SEQ ID NO: 2, trans-sialidase de SEQ ID NO:15, trans-sialidase de SEQ ID NO:16, trans-sialidase de SEQ ID NO:17, proteína de antígeno repetitivo flagelar de SEQ ID NO: 11, proteína associada ao microtúbulo de SEQ ID NO: 18, proteína de membrana citoplasmática de SEQ ID NO: 19, proteína de antígeno repetitivo flagelar de SEQ ID NO: 20 e fragmento do vetor de SEQ ID NO: 14.

15. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que compreende ainda pelo menos um ligador entre os referidos fragmentos.

16. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que compreende os aminoácidos 288 a 334 da SEQ ID NO: 2, os aminoácidos 776 a 809 da SEQ ID NO: 15, aminoácidos 724 a 743 da SEQ ID NO: 16, aminoácidos 682 a 705 da SEQ ID NO: 17, aminoácidos 19 a 47 da SEQ ID NO: 11, os aminoácidos 349 a 386 da SEQ ID NO: 18, aminoácidos 74 a 92 da SEQ ID NO: 19, aminoácidos 1 a 68 da SEQ ID NO: 20 e aminoácidos 1 a 18 da SEQ ID NO: 14.

17. Proteína recombinante ou sintética de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que é apresentada pela SEQ ID NO: 24 ou uma sequência com 90% de identidade com a SEQ ID NO: 24.

18. Sequência de DNA sintético, caracterizado pelo fato de

que codifica a proteína como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

19. Sequência de DNA sintético de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que é representado pela SEQ ID NOs: 25-28 ou uma sequência com 90% de identidade com as sequências SEQ ID NO: 25-28.

20. Sequência de DNA sintético de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que é otimizado para uso de códon para *Escherichia coli*.

21. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de DNA sintético como definido na reivindicação 18 ou 19.

22. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de DNA sintético como definido na reivindicação 18 ou 19 ou um cassete de expressão como definido na reivindicação 21.

23. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de DNA sintético como definido na reivindicação 18 ou 19, ou um vetor de expressão como definido na reivindicação 22 ou um cassete de expressão como definido na reivindicação 21.

24. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que o dito sistema procariótico compreende uma bactéria do gênero *Escherichia*.

25. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que é da espécie *Escherichia coli*.

26. Método para produzir uma proteína recombinante ou sintética, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) transferir para uma célula hospedeira uma sequência de DNA sintético como definido em qualquer uma das reivindicações 18 a 20 para obter uma célula hospedeira transformada ou transfectada;

(b) cultivar a célula hospedeira transformada ou transfectada para obter uma cultura de células;

(c) expressar a proteína recombinante ou sintética como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 17 em uma célula hospedeira transformada ou transfectada para produzir uma proteína recombinante ou sintética; e

(e) isolar a proteína recombinante da célula ou da cultura de célula.

27. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 17 ou uma combinação de duas ou mais proteínas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

28. Composição de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de ser utilizada em um método para diagnóstico de doença de Chagas ou kit para diagnóstico da doença de Chagas.

29. Uso da proteína recombinante ou sintética como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de uma composição para diagnóstico de doença de Chagas.

30. Kit para diagnóstico da doença de Chagas, caracterizado pelo fato de que compreende uma ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas como definidas na reivindicação 1 ou uma composição como definida na reivindicação 27.

31. Kit para diagnóstico da doença de Chagas de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que compreende um meio de detecção para detectar o complexo antígeno-anticorpo.

32. Kit de acordo com a reivindicação 30 ou 31, caracterizado pelo fato de que compreende instruções de uso.

33. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 32, caracterizado pelo fato de que compreende ainda controle positivo de



reação.

34. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 33, caracterizado pelo fato de que é desenvolvido para ensaios imunoenzimáticos (EIE), ensaios imunocromatográficos e microarranjo líquido.

35. Kit de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que os ensaios imunoenzimáticos (EIE) são ensaios do tipo indireto.

36. Método para diagnóstico da Doença de Chagas, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

(a) prover uma ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas como definida na reivindicação 1 ou uma composição como definida na reivindicação 27;

(b) contatar as ditas uma ou mais proteínas recombinantes ou sintéticas ou a dita composição com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/ antígeno; e

(c) detectar o complexo antígeno/ anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/ anticorpo.

DESENHOS

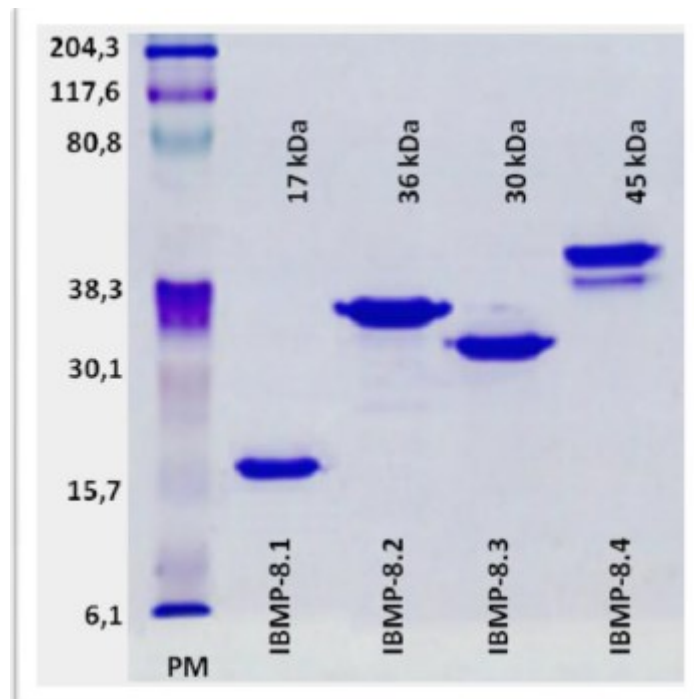


FIGURA 1

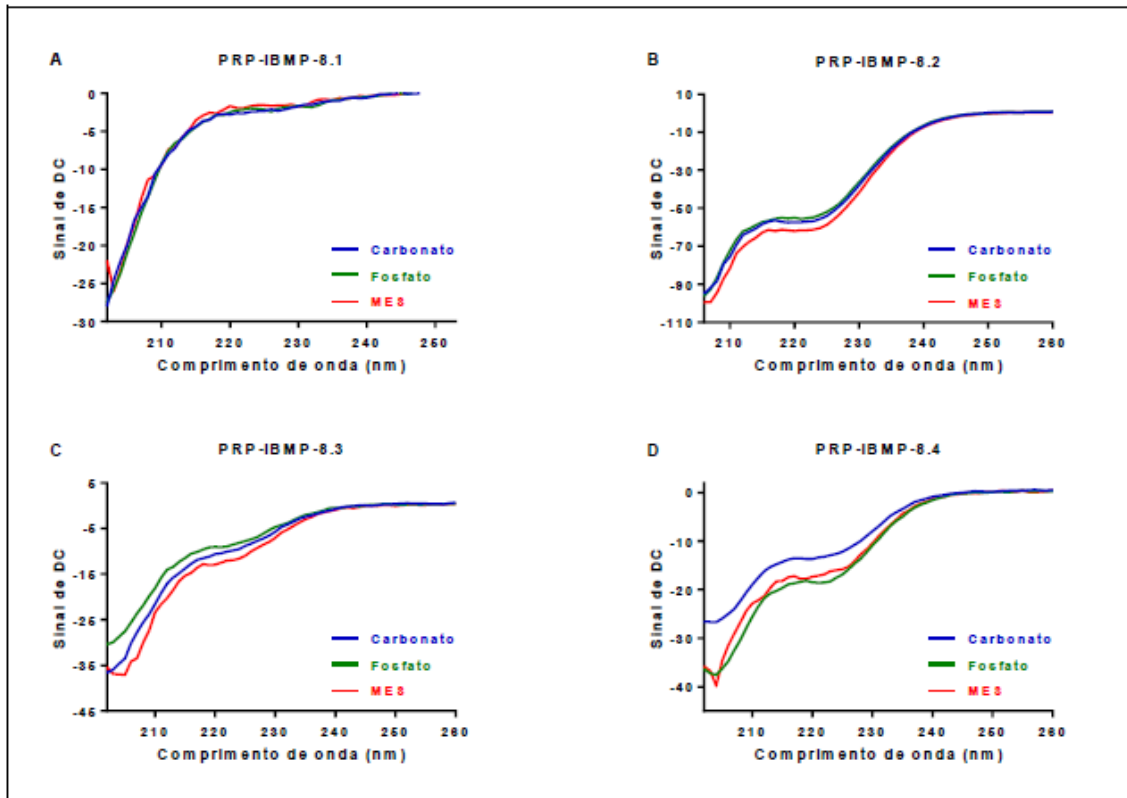


FIGURA 2

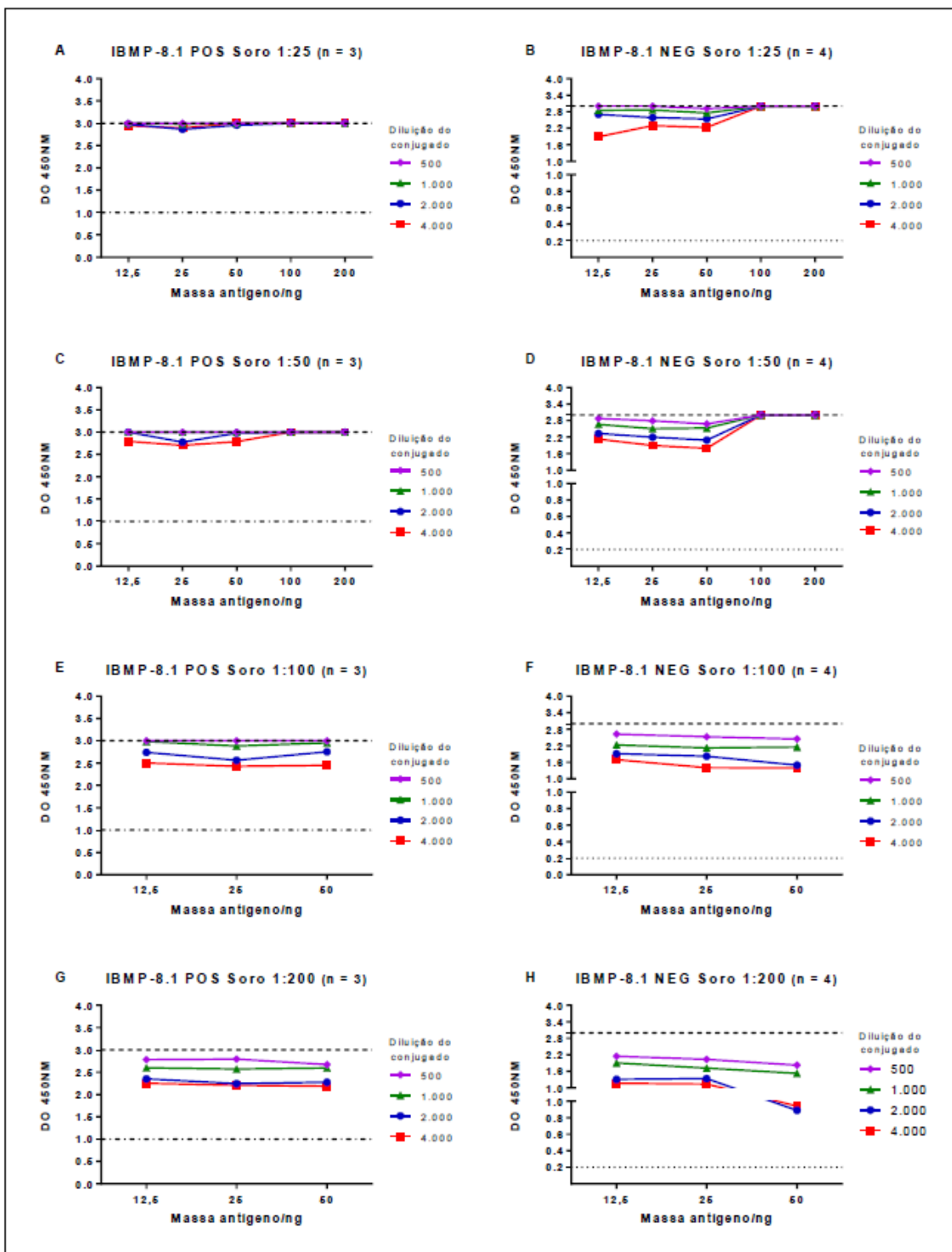


FIGURA 3

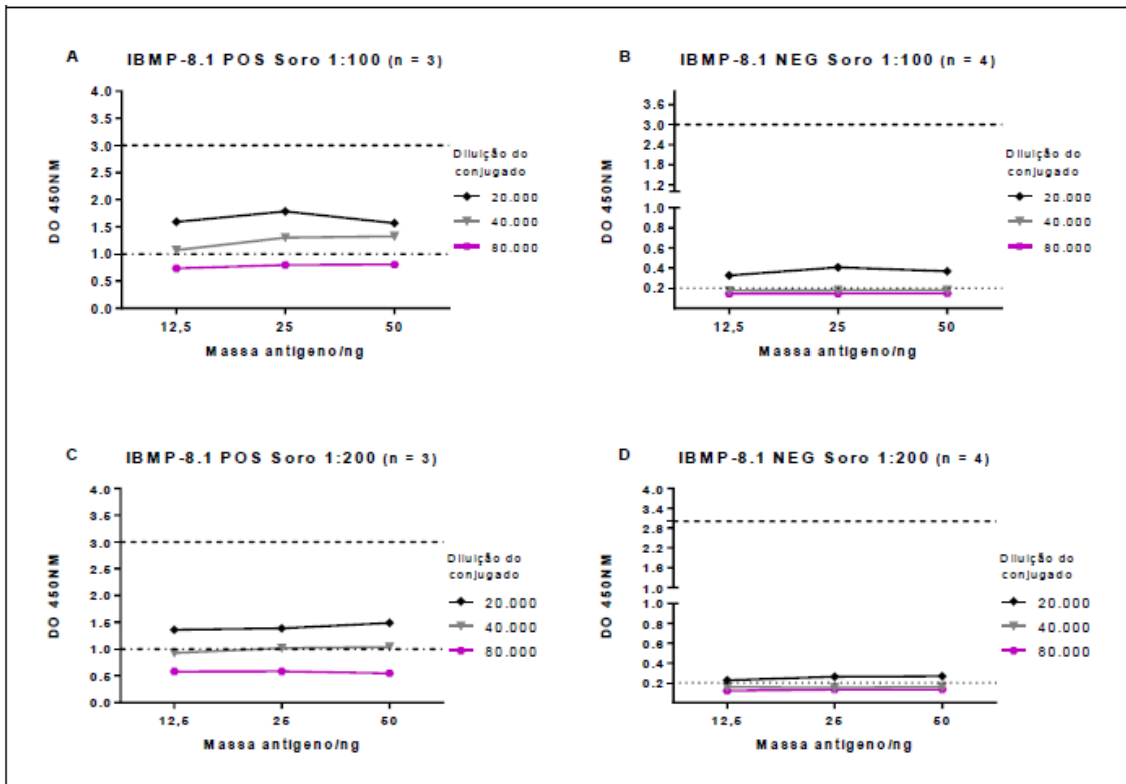


FIGURA 4

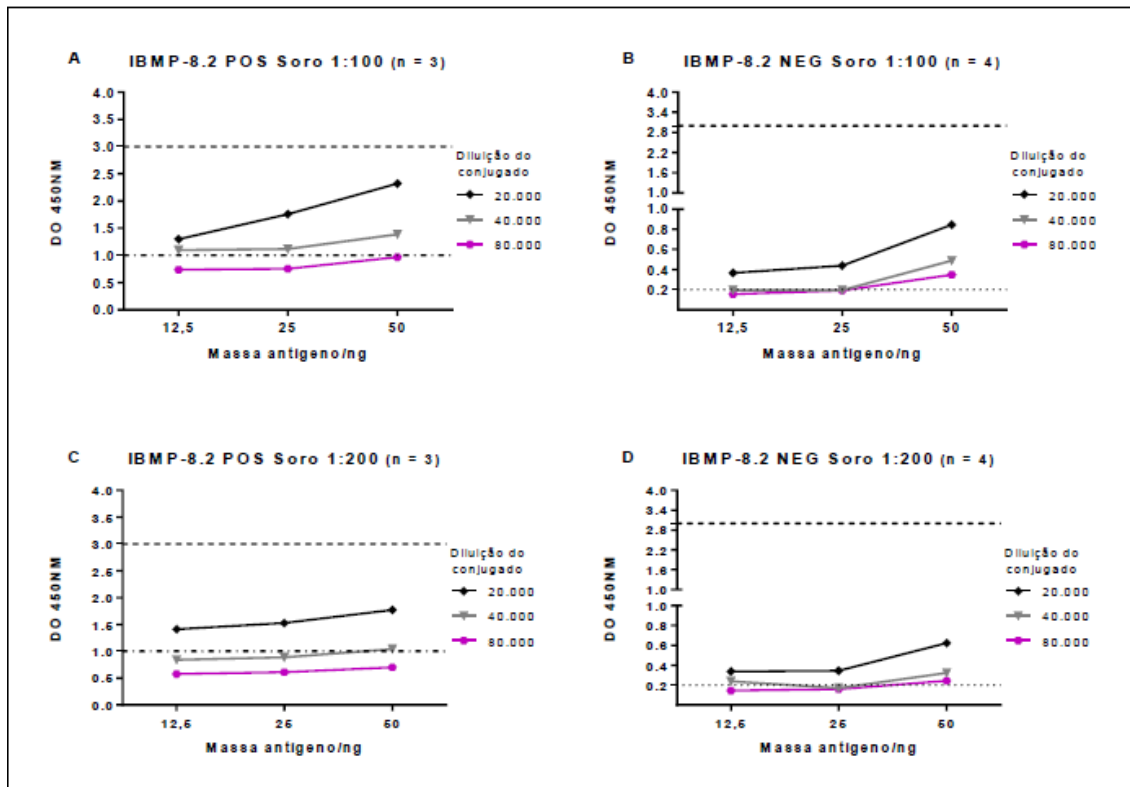


FIGURA 5

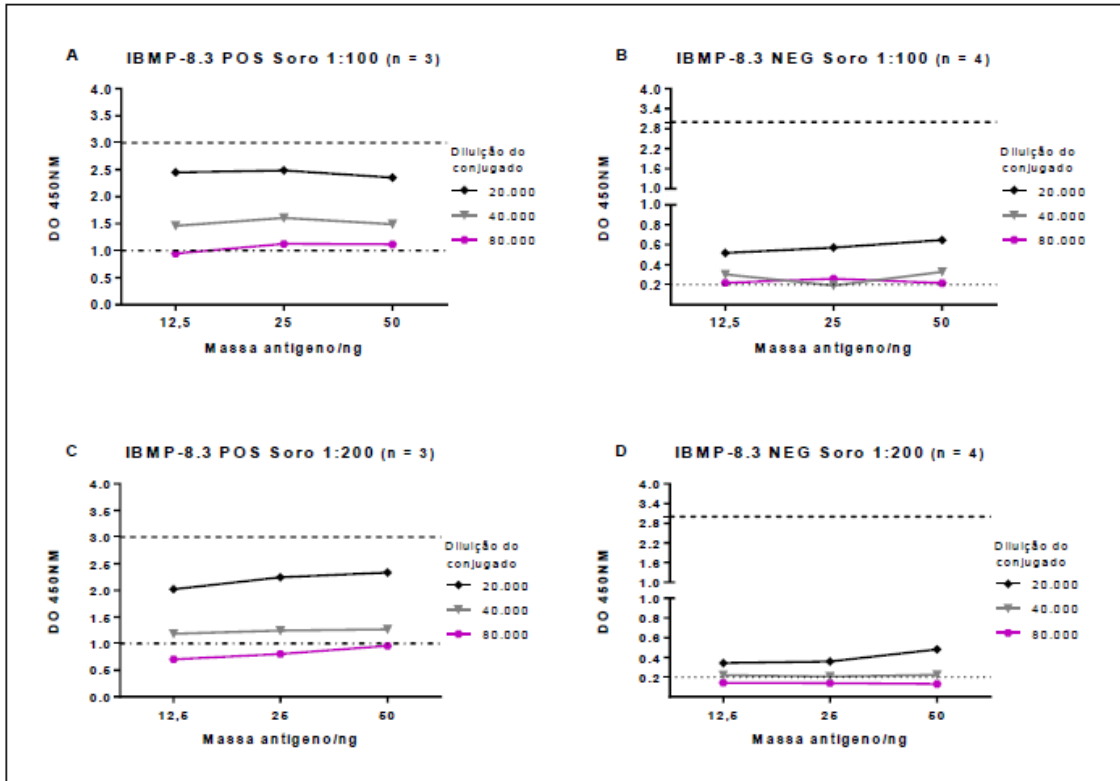


FIGURA 6

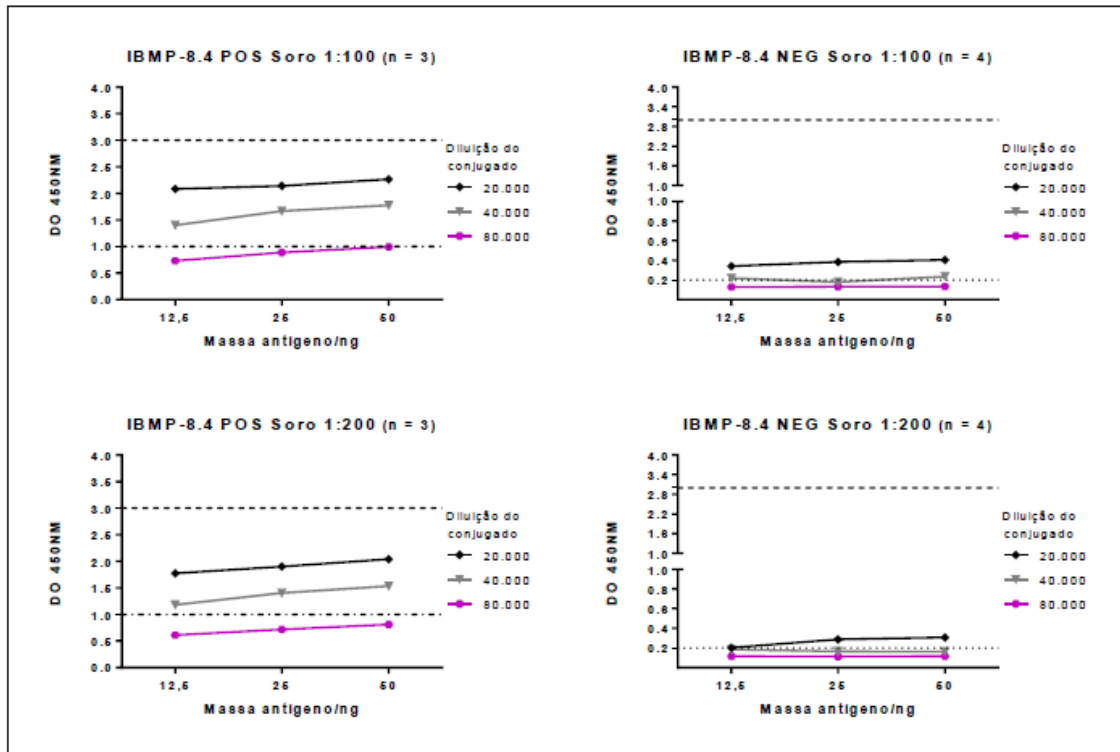


Figura 7



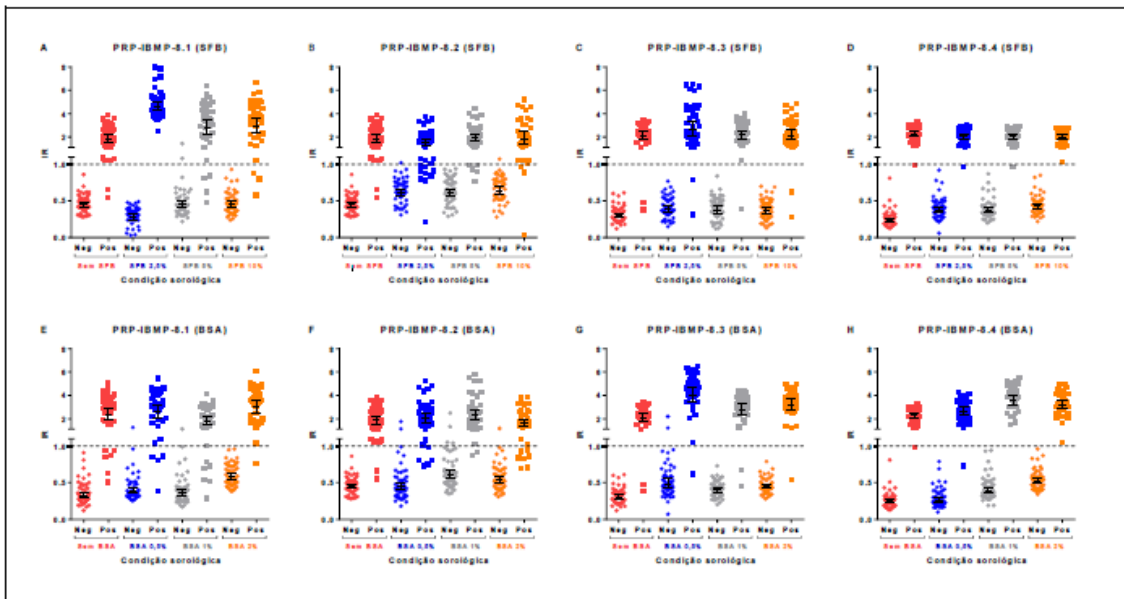


FIGURA 8

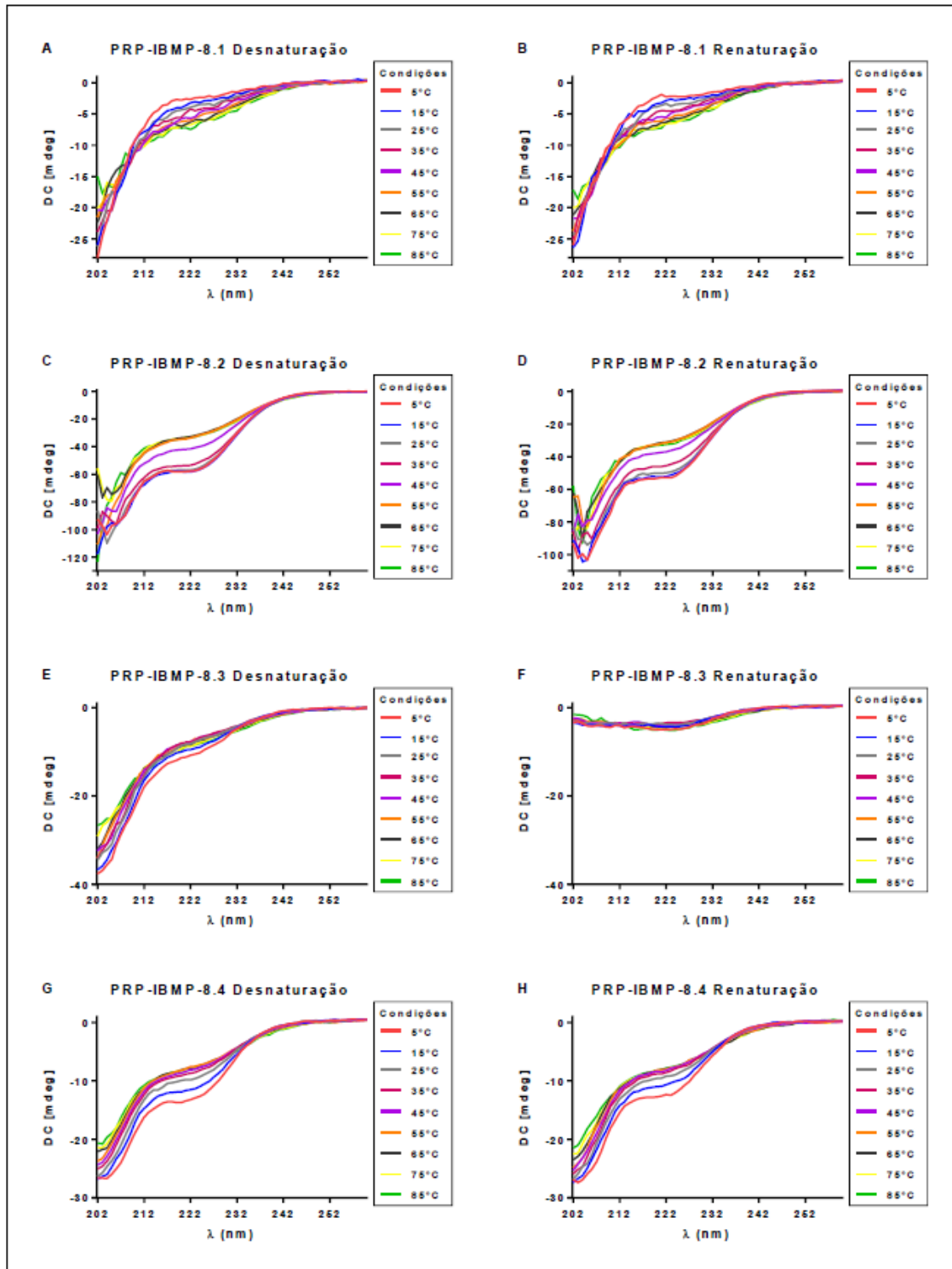


FIGURA 9

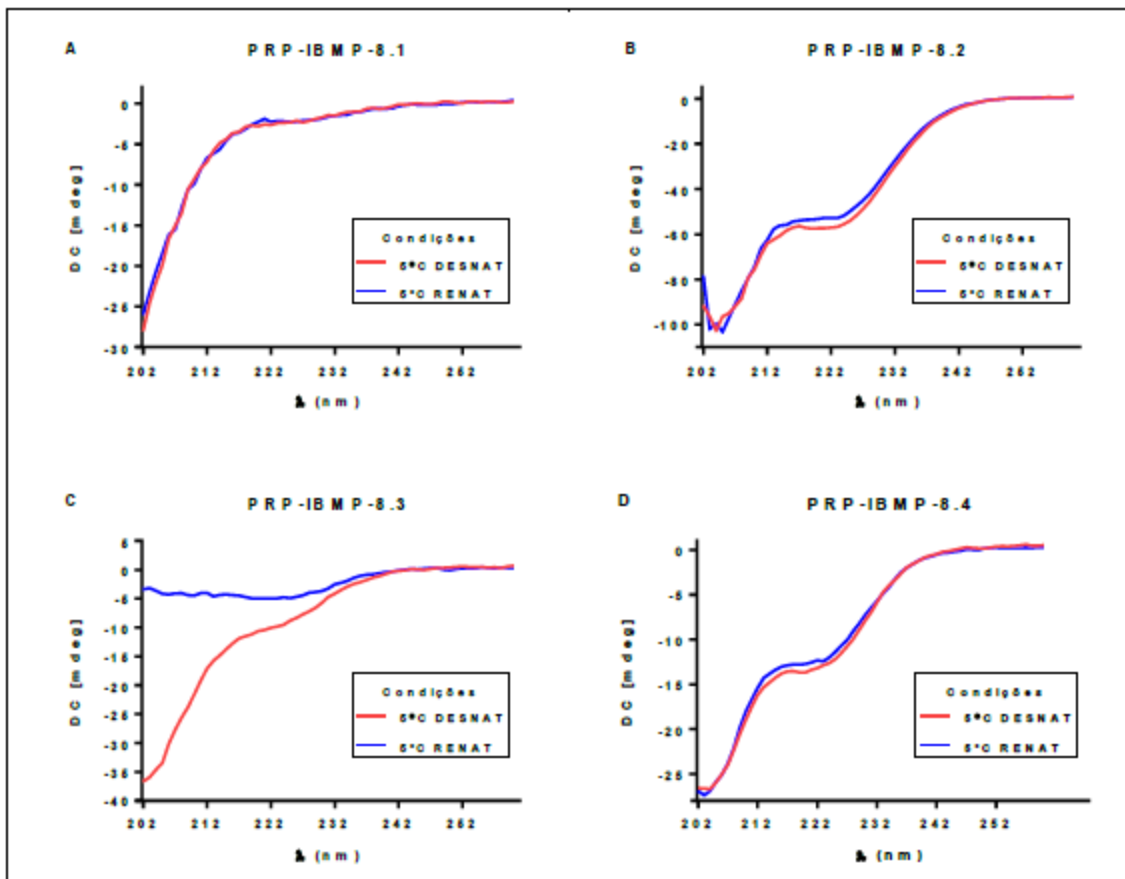


FIGURA 10

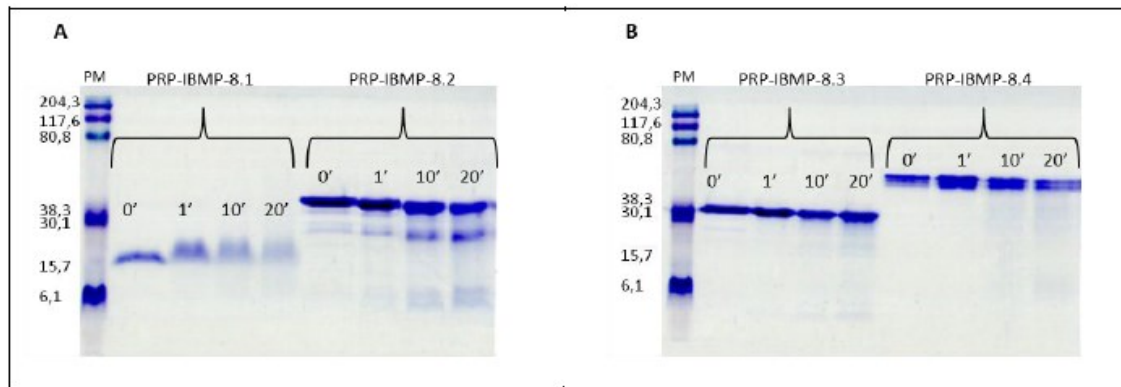


FIGURA 11

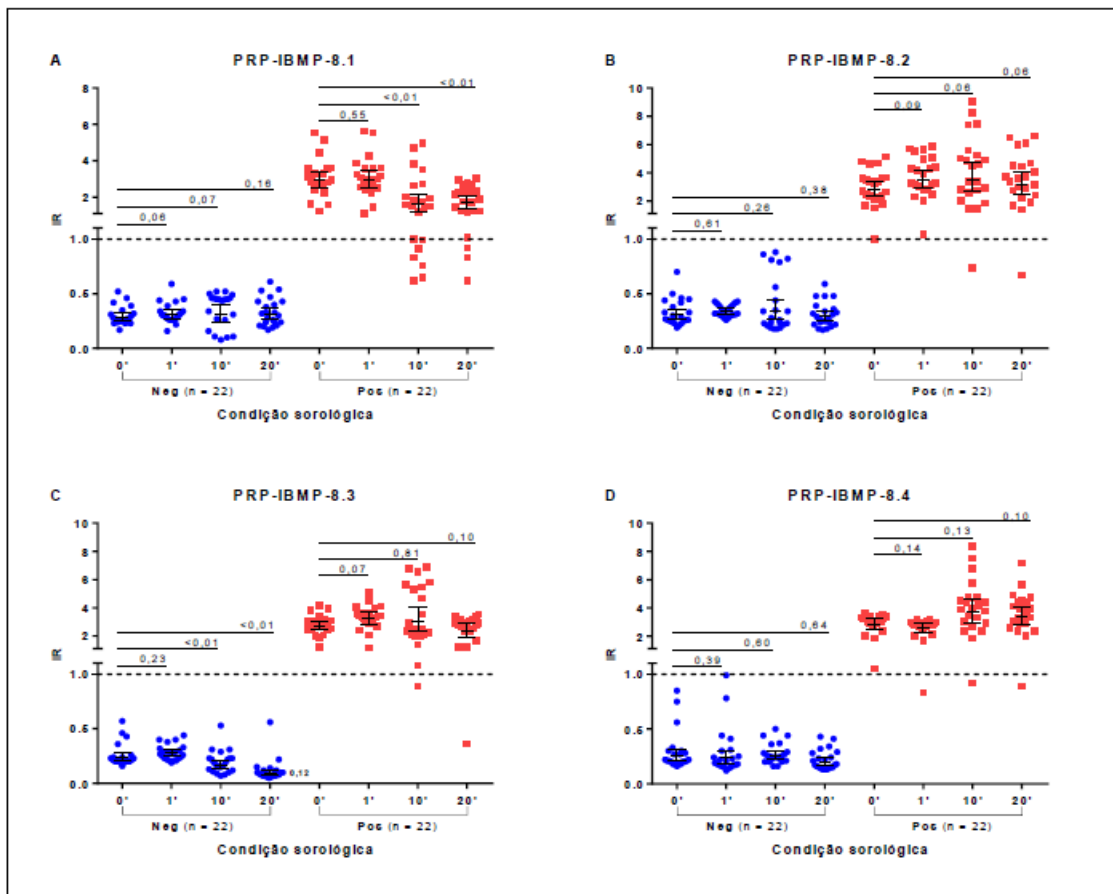


FIGURA 12

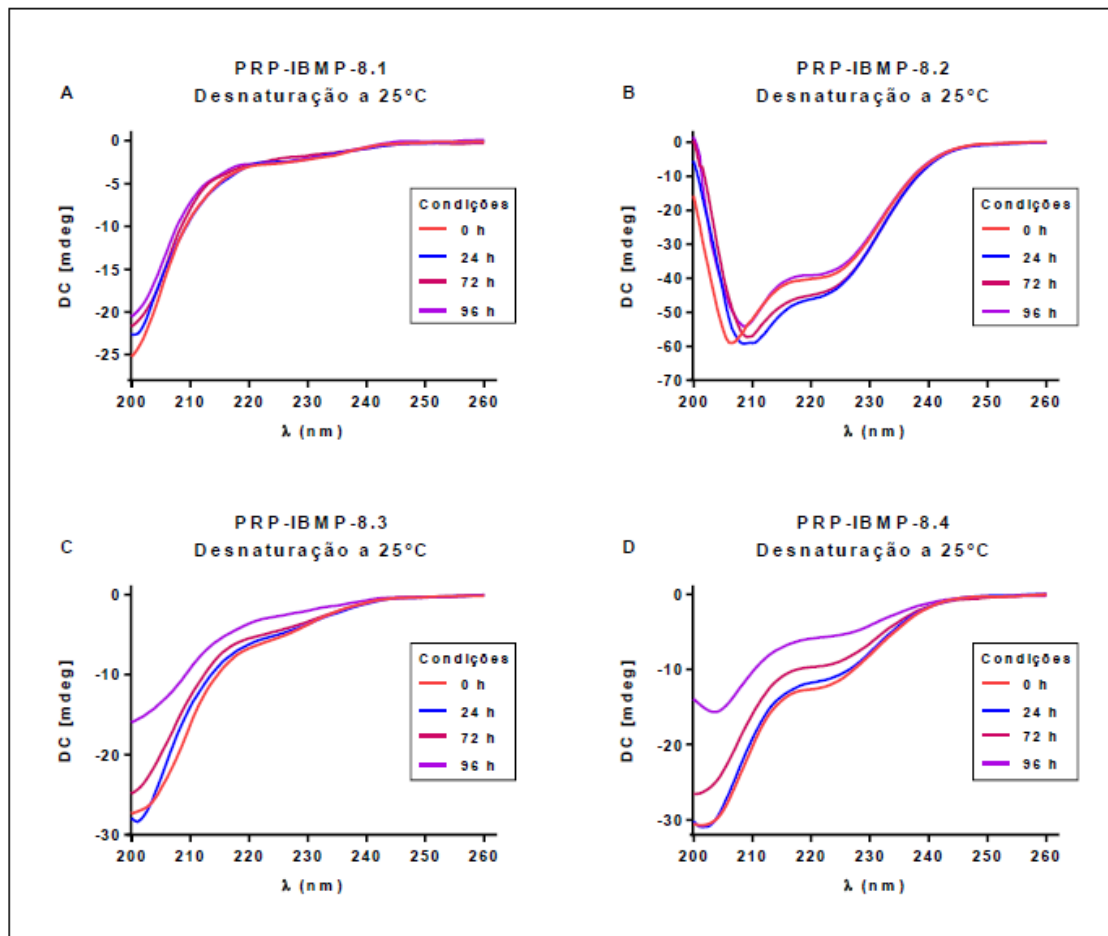


FIGURA 13

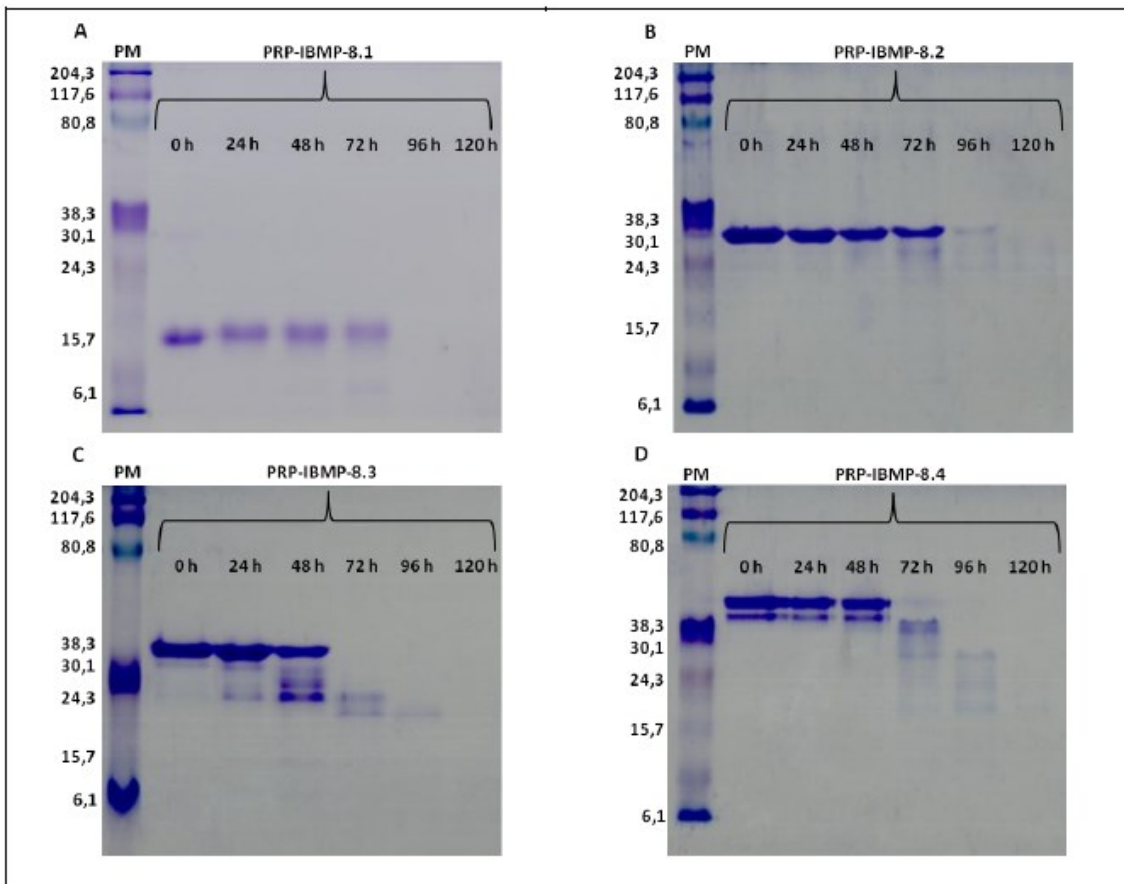


FIGURA 14

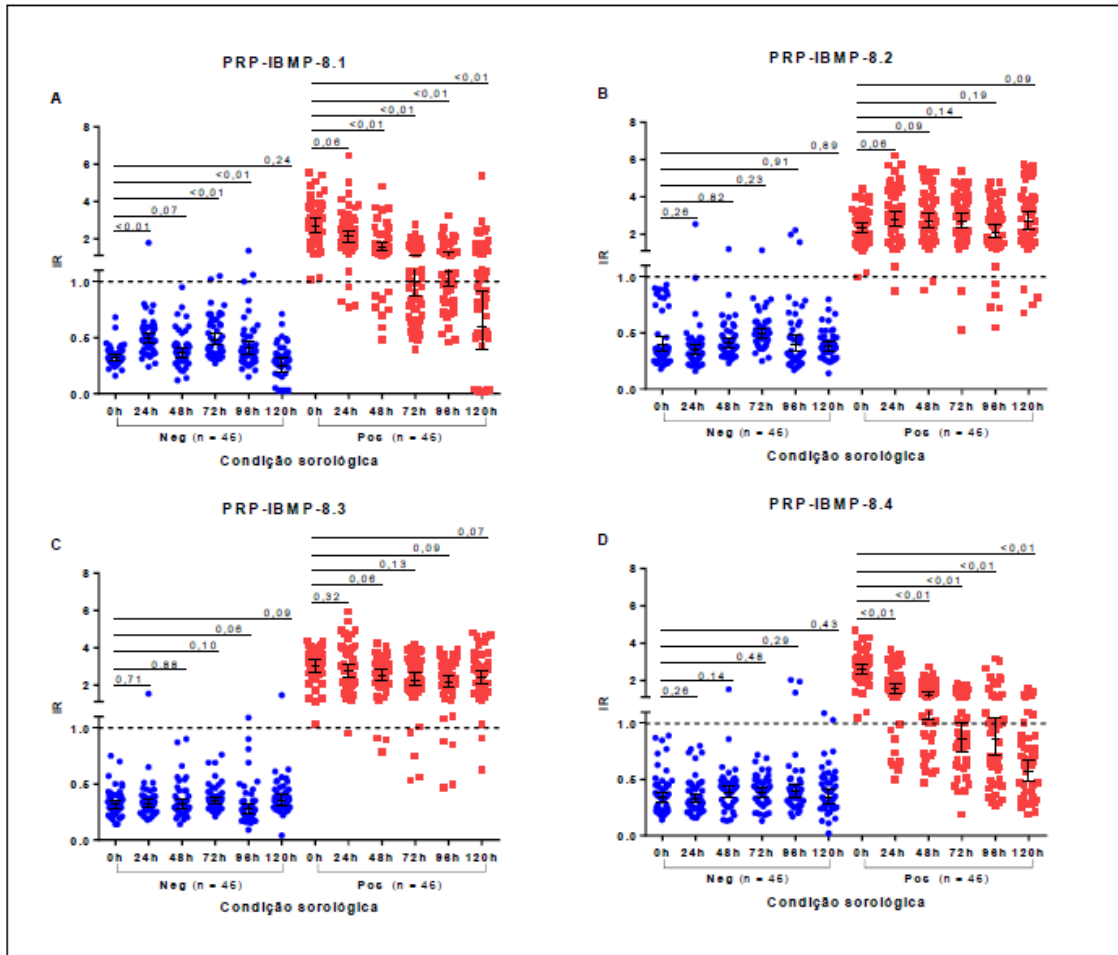


FIGURA 15



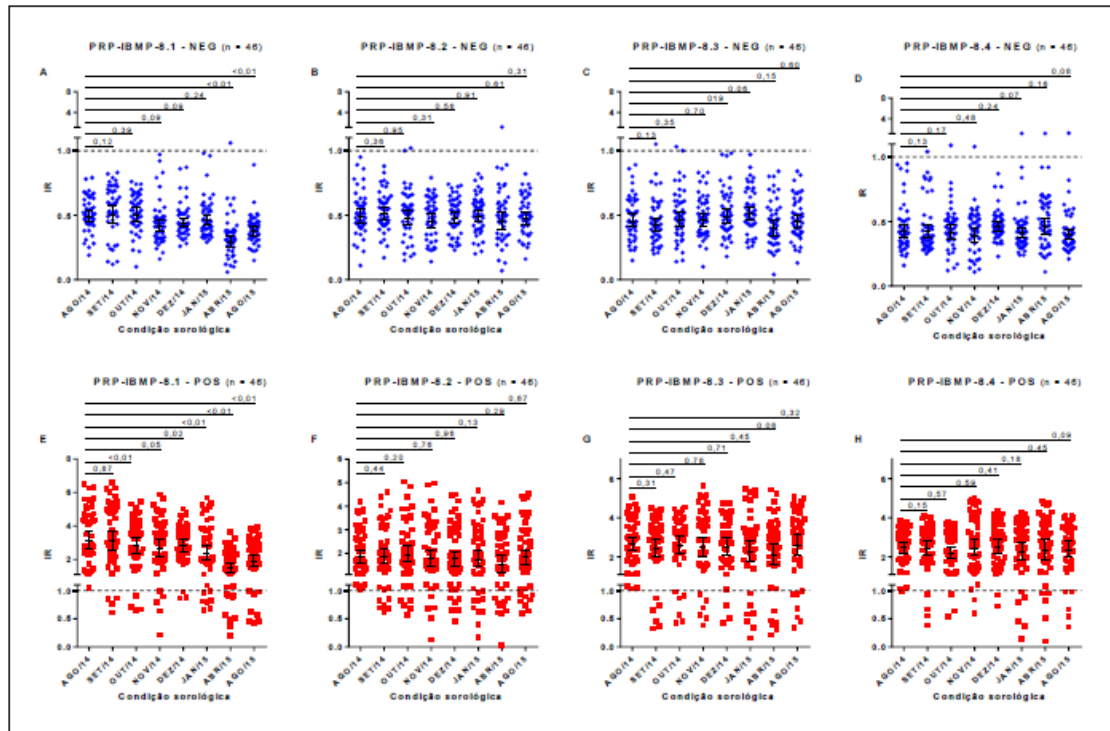


FIGURA 16

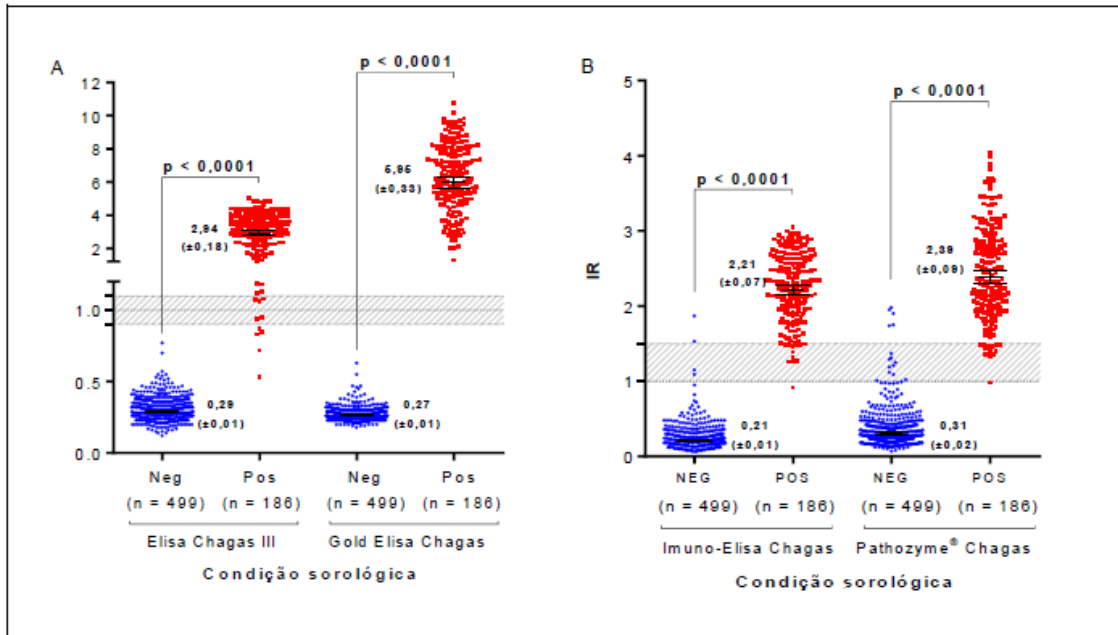


FIGURA 17

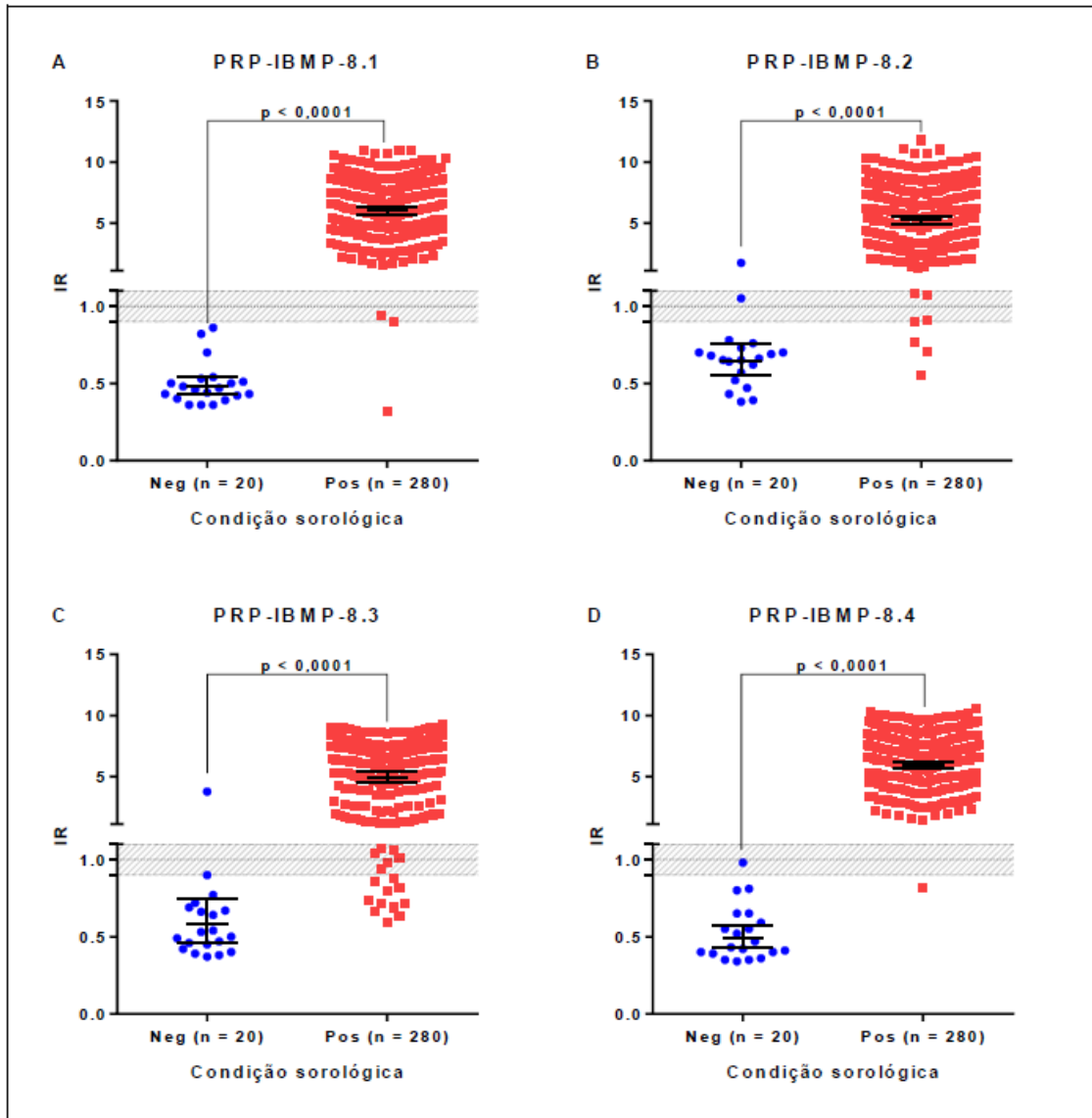


FIGURA 18

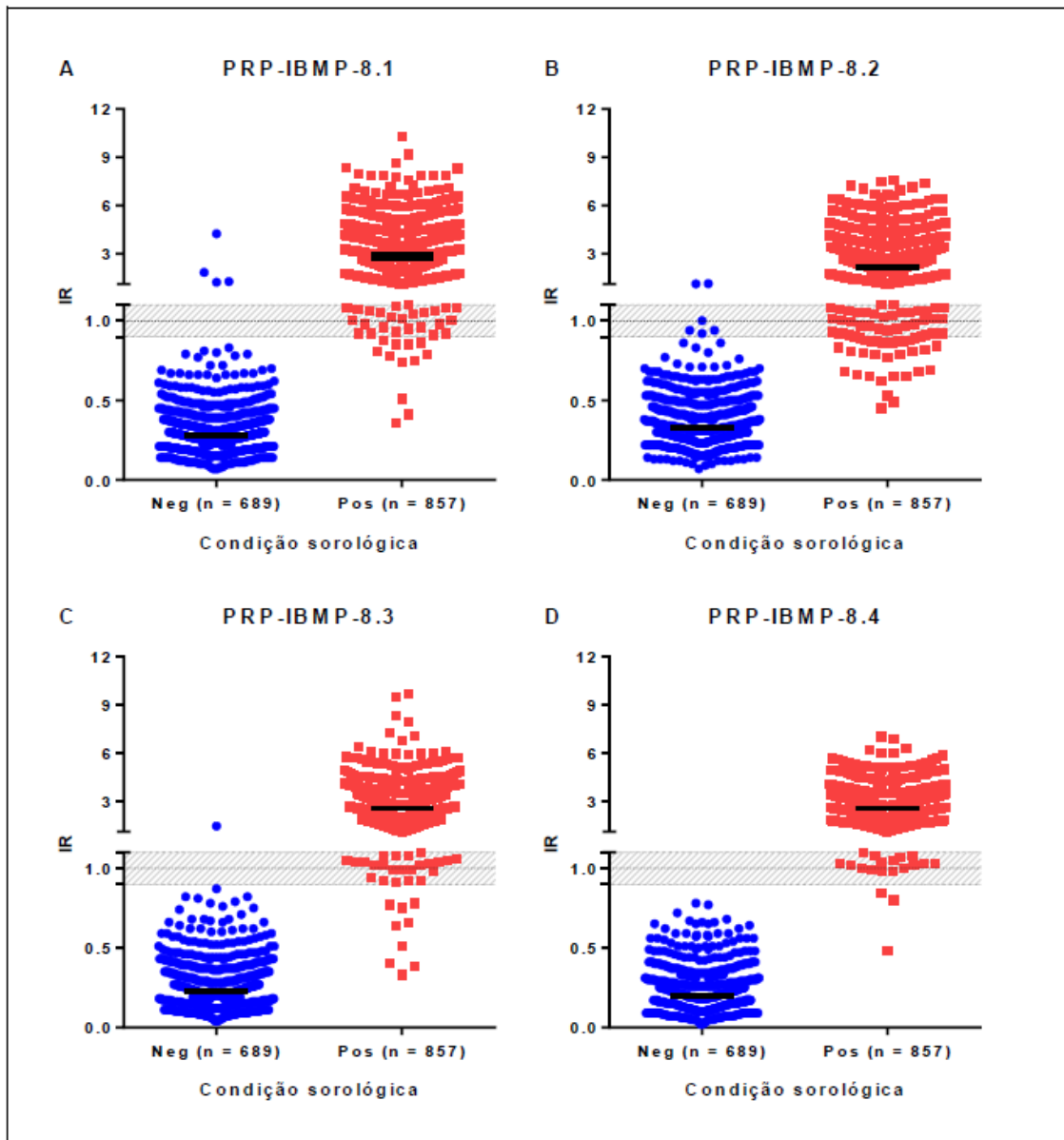


FIGURA 19

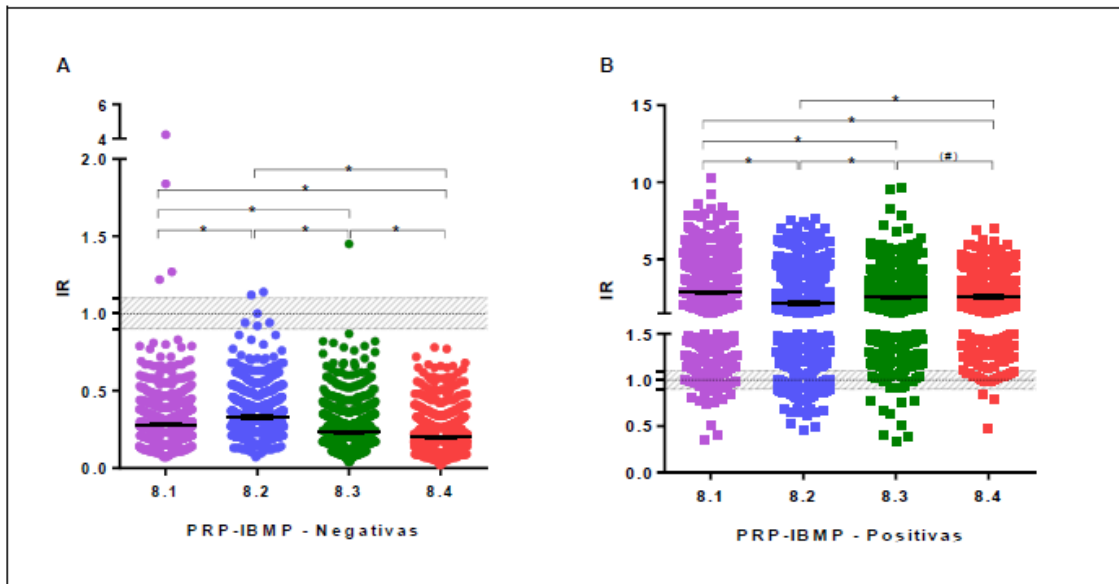


FIGURA 20

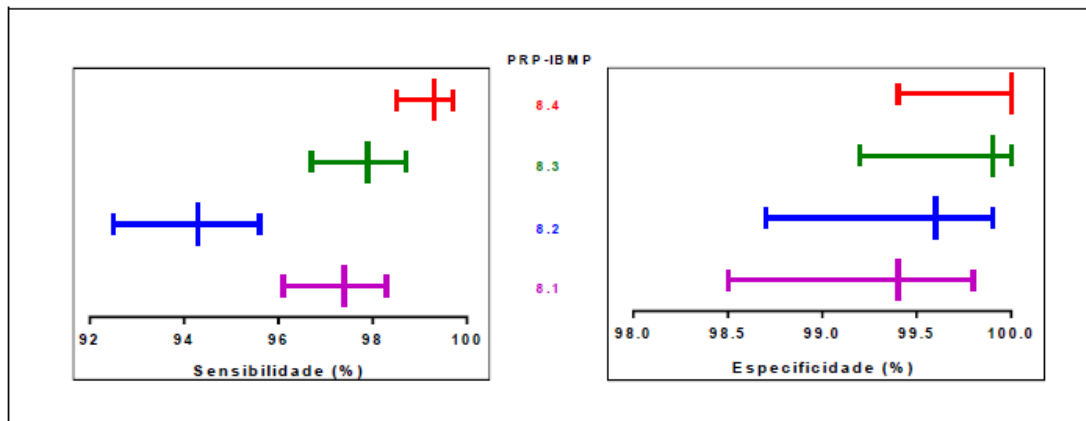


FIGURA 21

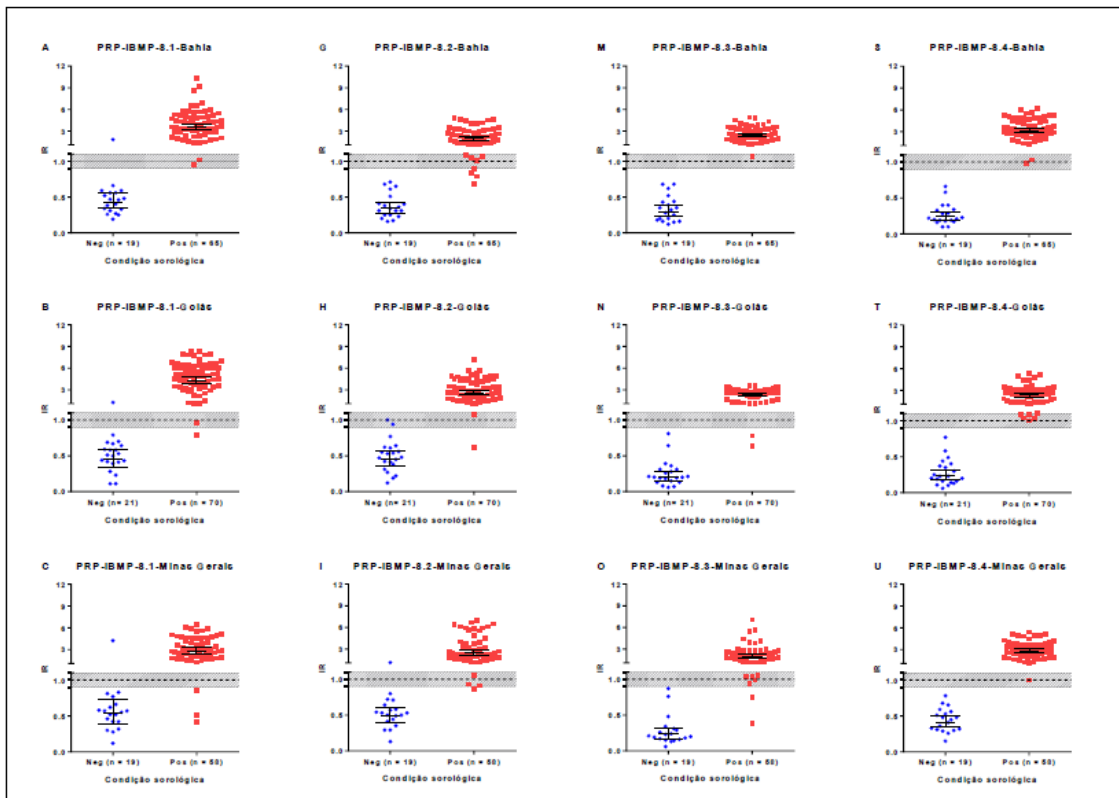


FIGURA 22

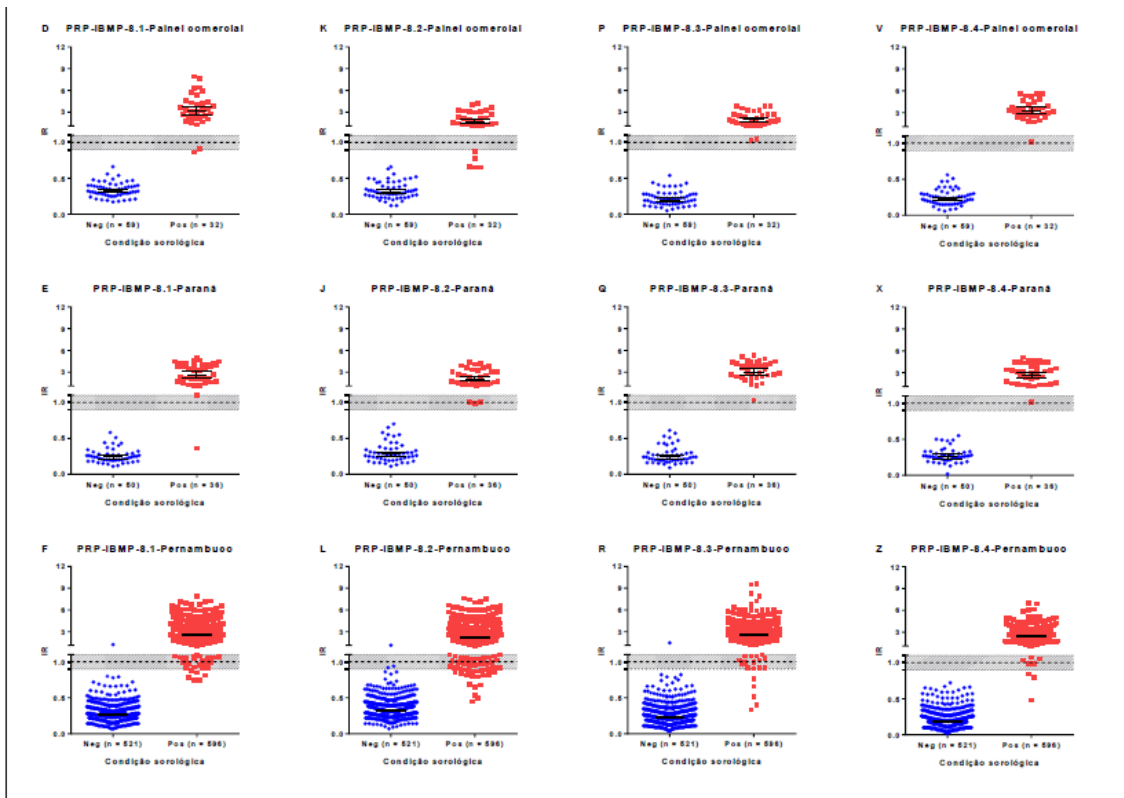


FIGURA 23



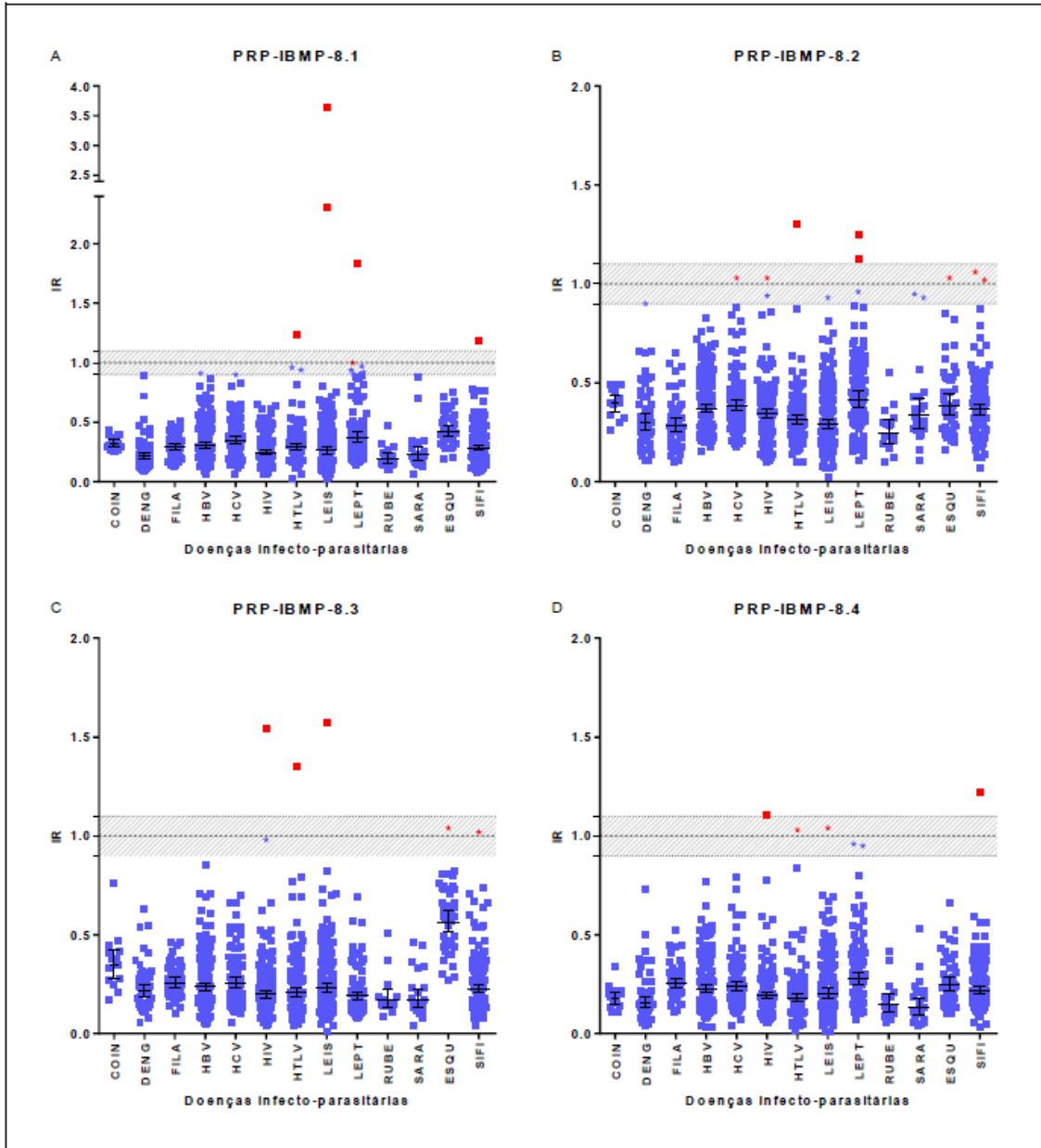


FIGURA 24

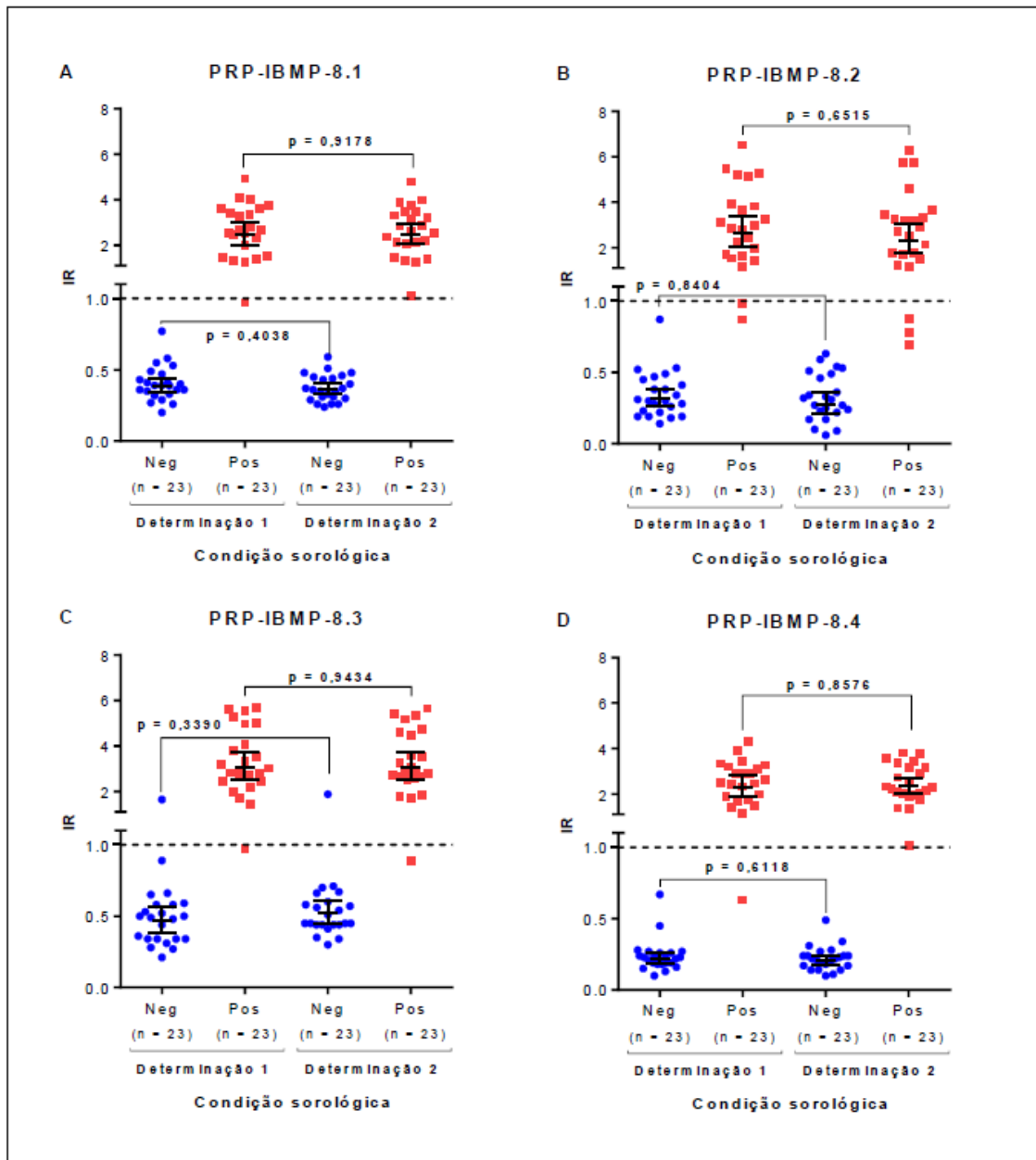


FIGURA 25

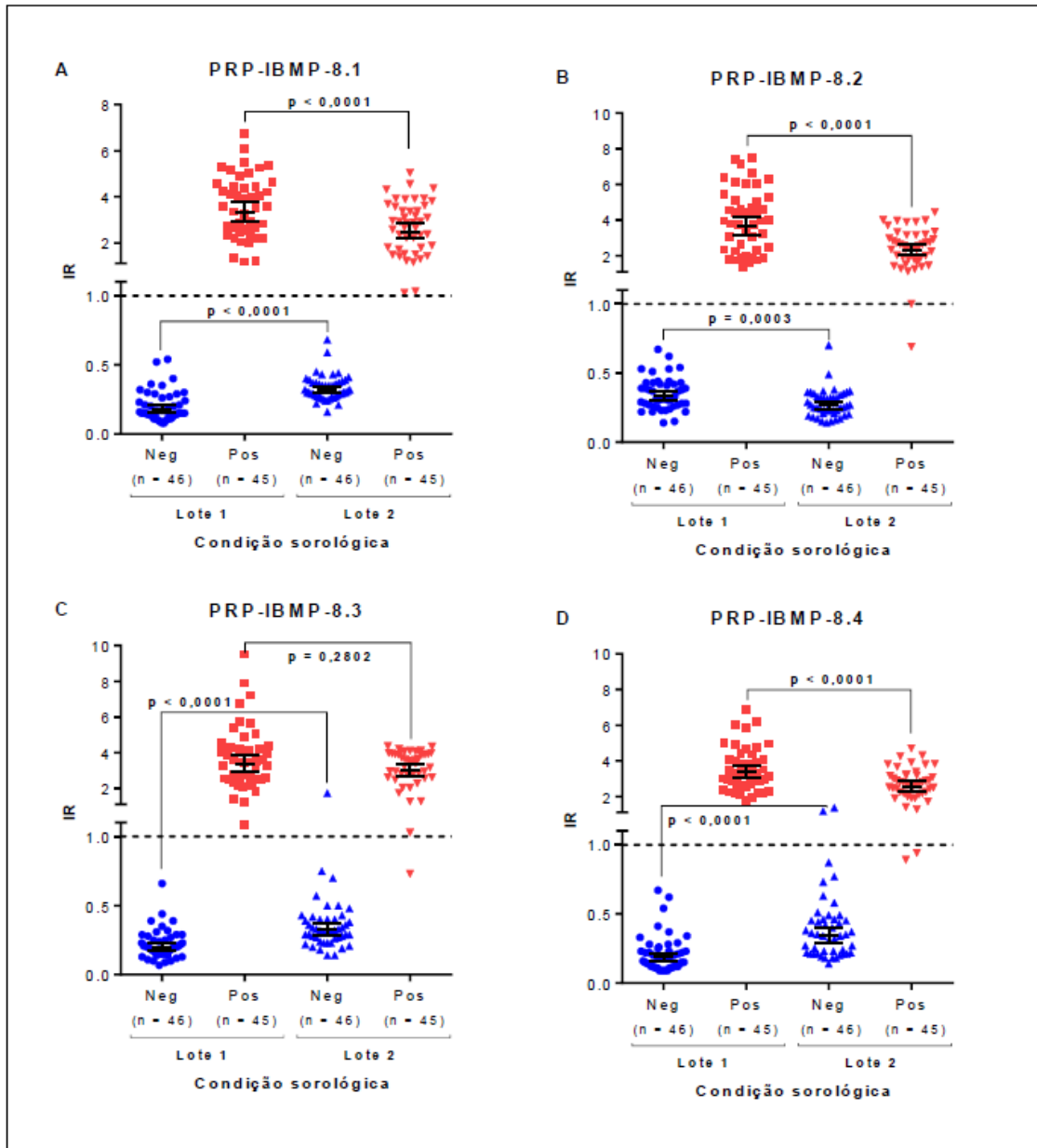


FIGURA 26

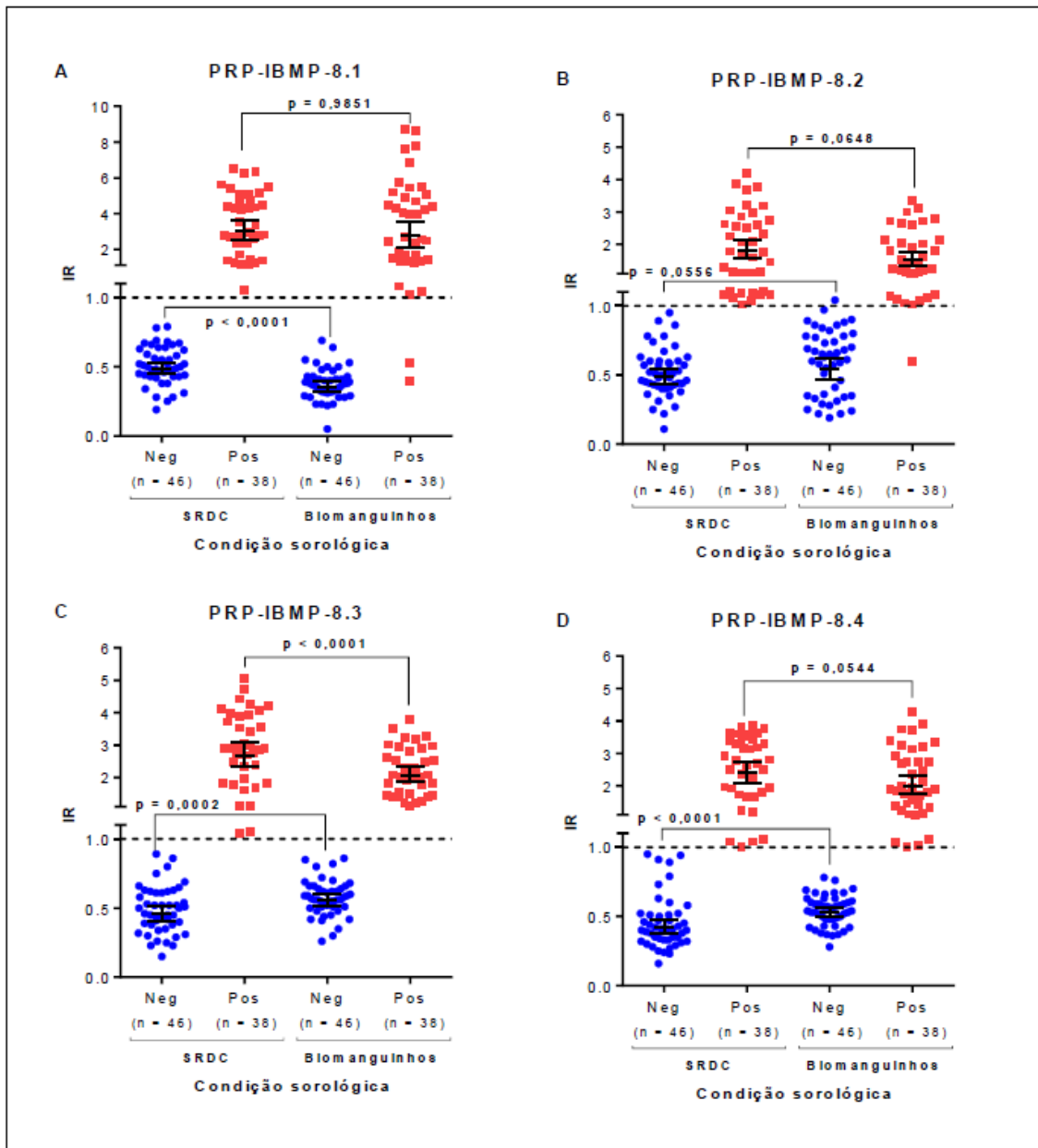


FIGURA 27

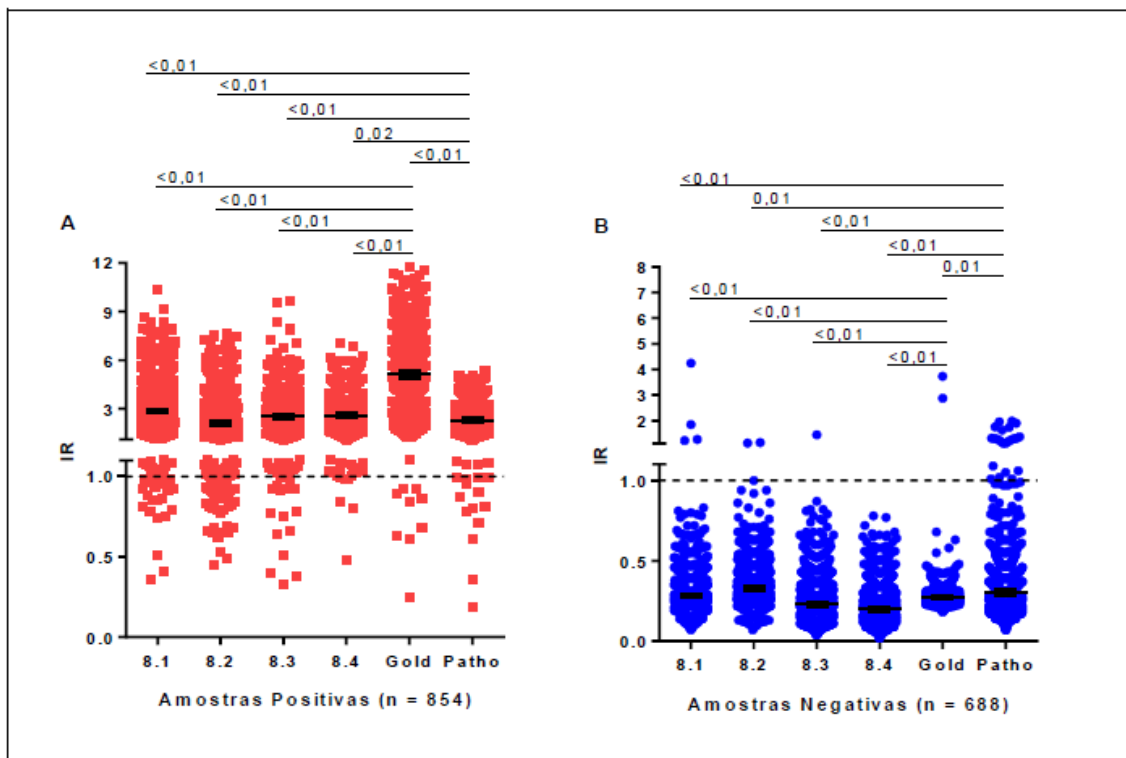


FIGURA 28

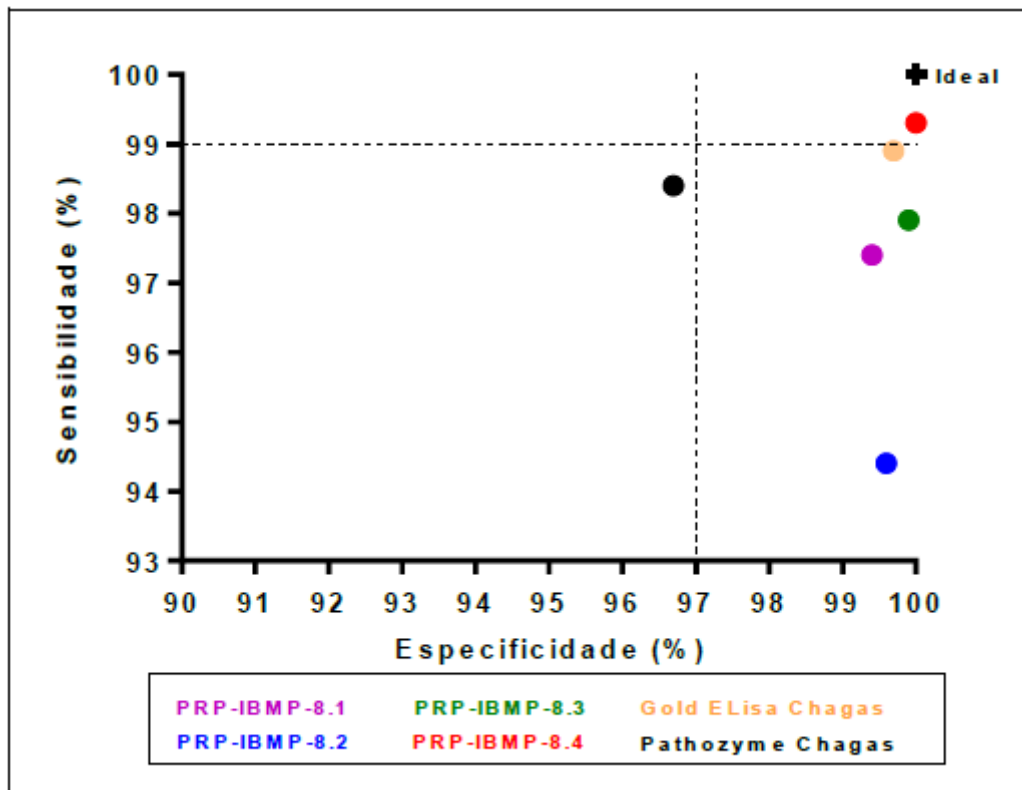


FIGURA 29

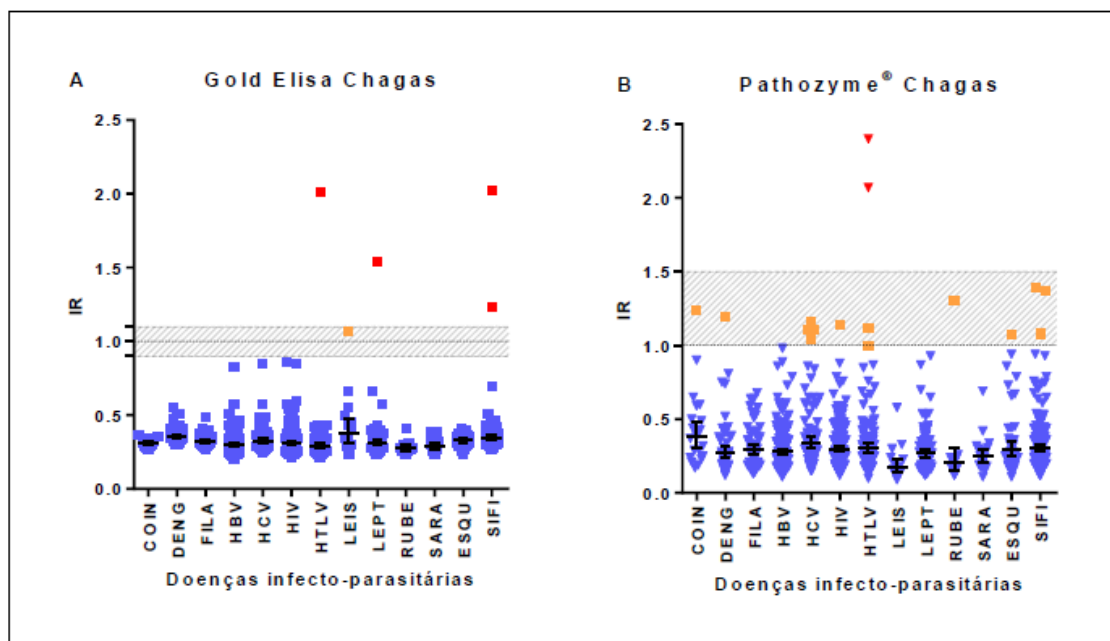


FIGURA 30

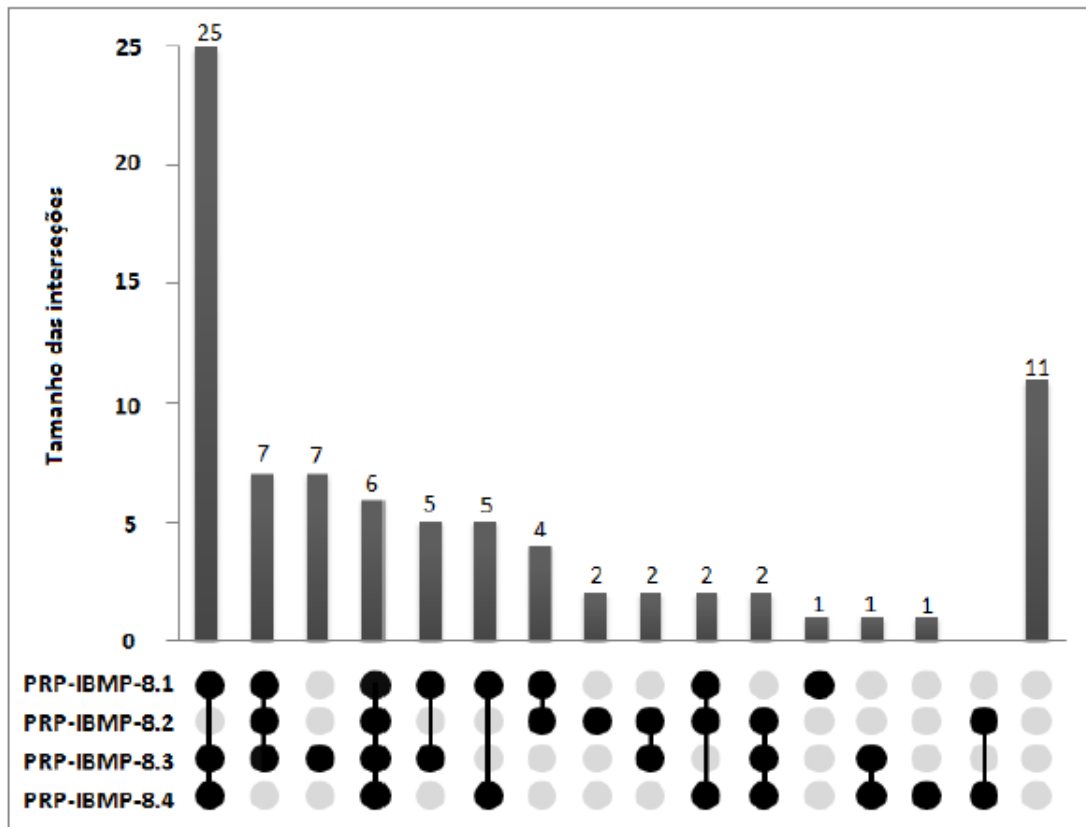
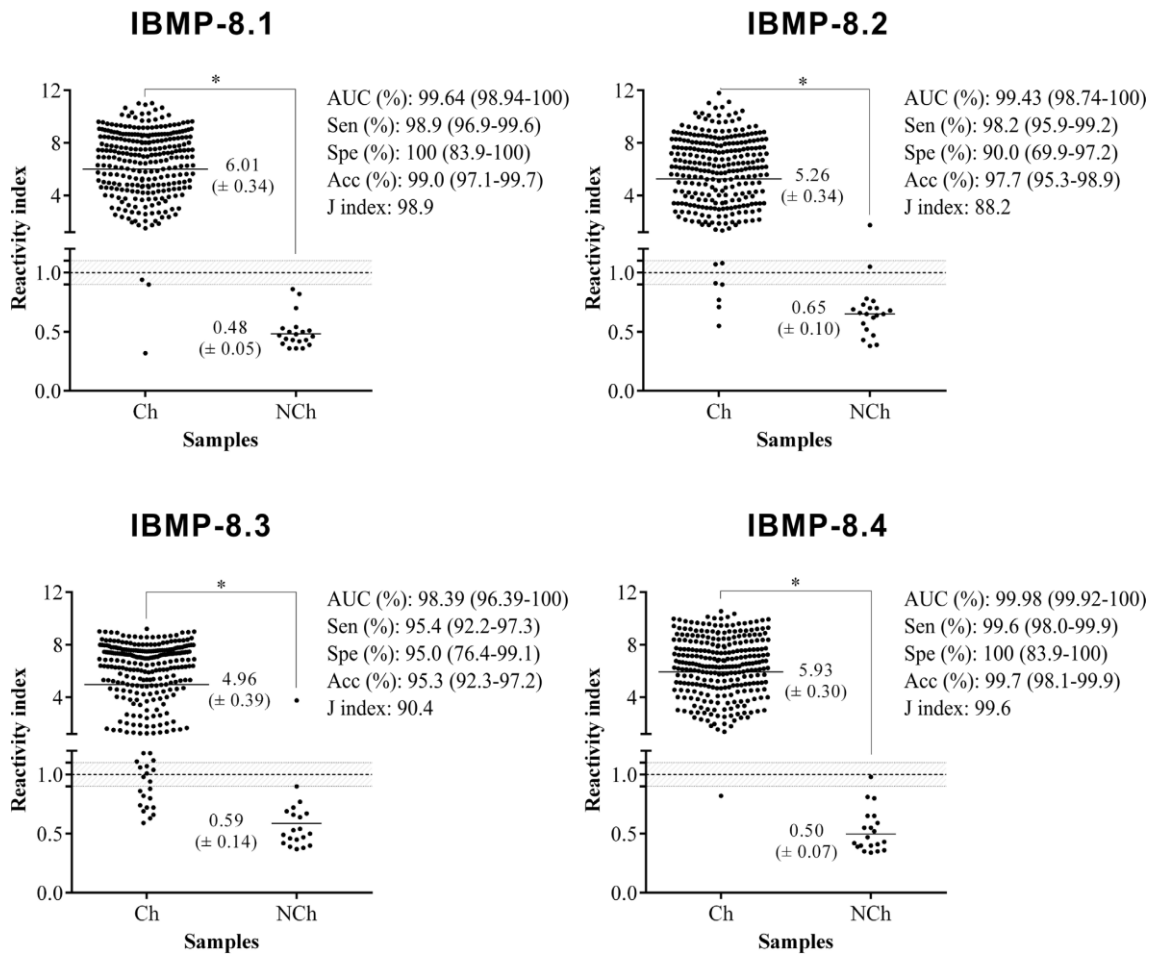


FIGURA 31



**ELISA**



**FIGURA 32**

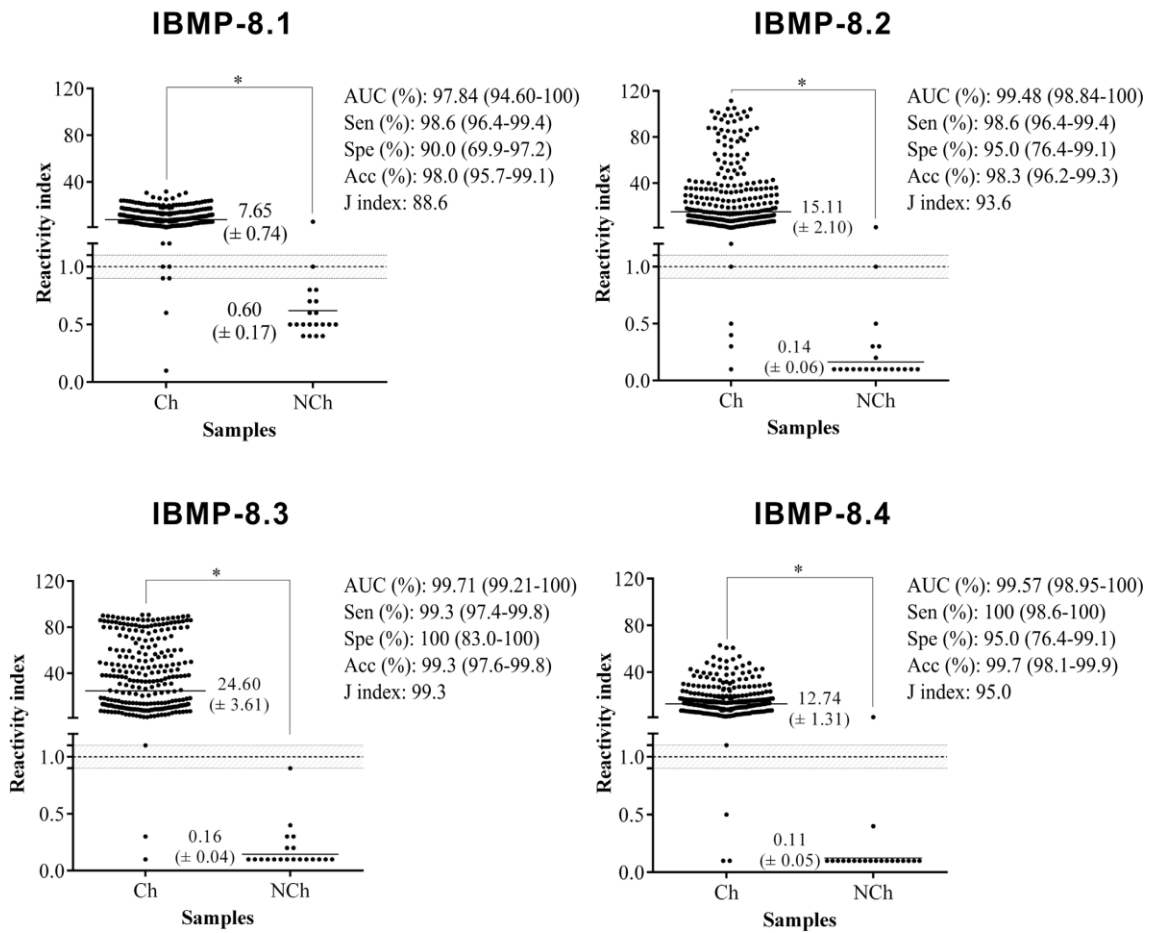


FIGURA 33

RESUMO

“PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, SEQUÊNCIA DE DNA SINTÉTICO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, COMPOSIÇÃO, USO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE OU SINTÉTICA, KIT PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS, E, MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS”

A presente invenção refere-se a uma proteína recombinante ou sintética com atividade imunogênica, útil para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença de Chagas. A invenção também se refere à sequência de DNA sintético, cassete de expressão, vetor de expressão, célula hospedeira, método de produção da proteína recombinante ou sintética, composição, uso da proteína recombinante ou sintética, kit para diagnóstico da doença de chagas, bem como ao método para diagnóstico da doença de chagas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 135820.txt
- Data de Geração do Código: 07/08/2018
- Hora de Geração do Código: 16:09:17
- Código de Controle:
  - Campo 1: 0B9ED922A7313226
  - Campo 2: 6816A041632B3DFB