



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

(21) BR 102015027885-3 A2



(22) Data do Depósito: 23/10/2015

(43) Data da Publicação Nacional: 20/10/2020

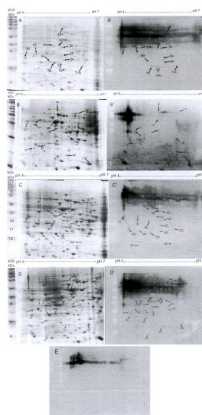
**(54) Título:** PROCESSO E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS

**(51) Int. Cl.:** G01N 33/569; G01N 33/531; C07K 4/00.

**(71) Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS; UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG.

**(72) Inventor(es):** SEMÍRAMIS JAMIL HADAD DO MONTE; RAFAEL MELO SANTOS DE SERPA BRANDÃO; LILINE MARIA SOARES MARTINS; HÉLIDA MONTEIRO DE ANDRADE; MARILENE HENNING VAINSTEIN; ADALBERTO SOCORRO DA SILVA.

**(57) Resumo:** PROCESSO E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS. Compreende-se a presente patente de invenção a um processo que descreve a utilização de peptídeos sintéticos imunorreativos para o desenvolvimento de um kit para teste imunodiagnóstico da criptococose, a partir da seleção de peptídeos sintéticos oriundos da identificação de proteínas imunorreativas de *Cryptococcus* spp., por análises proteômicas, e de bioinformática, seguido da síntese de peptídeos e realização de imunoensaios, objetivando seu uso como teste imunodiagnóstico mais eficiente para criptococose humana, tendo em vista a alta especificidade e sensibilidade destes antígenos.



“PROCESSO E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE  
UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS”

001. Refere-se a presente patente de invenção, que diz respeito às instituições de pesquisas na área médica laboratorial, a um processo que descreve a utilização de peptídeos sintéticos imunorreativos para o desenvolvimento de um kit para teste imunodiagnóstico da criptococose, a partir da seleção de peptídeos sintéticos oriundos da identificação de proteínas imunorreativas de *Cryptococcus* spp., por análises proteômicas, e de bioinformática, seguido da síntese de peptídeos e realização de imunoenaios, objetivando seu uso como teste imunodiagnóstico mais eficiente para criptococose humana, tendo em vista a alta especificidade e sensibilidade destes antígenos.

002. Criptococose é uma importante micose que acomete humanos e animais no mundo todo, manifestando-se, predominantemente, por infecções no trato respiratório e meningoencefalite, colocando-se entre as infecções fúngicas emergentes de significativa morbiletalidade. A doença é causada por duas espécies do gênero *Cryptococcus*: *Cryptococcus neoformans* (genótipos VNI-VNIV) e *Cryptococcus gattii* (genótipos VGI-VGIV), caracterizados por uma levedura arredondada, ovalada ou elipsóide, geralmente envolta por cápsula de mucopolissacarídeo, encontrada no meio ambiente em detritos de origem vegetal e animal, como excretas de pombos e outras aves.

003. O *Cryptococcus neoformans* tem distribuição mundial e é uma importante causa de morbimortalidade em indivíduos imunocomprometidos pelo HIV/AIDS, usuários de imunossuppressores, portadores de desordens linfoproliferativas, dentre outros. Em contraste, as infecções causadas por *Cryptococcus gattii* prevalecem em regiões de clima tropical e subtropical, acometendo predominantemente hospedeiros imunocompetentes. Entretanto, *Cryptococcus gattii* tem emergido em países de clima temperado, como na costa oeste do Canadá e dos Estados Unidos, o que demonstra que o fungo pode se adaptar a novos ambientes, causando surtos tanto em humanos quanto em animais.

004. No Brasil, a criptococose não é de notificação compulsória, logo os dados referentes à incidência e prevalência relacionadas à criptococose são provenientes de estimativas. Contudo, sabe-se que, *Cryptococcus neoformans*

ocorre em todas as regiões do país. No entanto, *Cryptococcus gattii* comporta-se como patógeno primário, infectando indivíduos HIV-negativos e sem qualquer evidência de imunodepressão, de ambos os gêneros.

005. Estudos clinico-epidemiológicos mostram a importância da criptococose causada por *Cryptococcus gattii* em crianças e adultos jovens no norte e nordeste do Brasil, representando um terço dos casos internados, com letalidade que varia entre 35 a 50%, comportando-se assim como uma endemia regional.

006. A infecção causada por *C. neoformans* ou *Cryptococcus gattii* ocorre por inalação de propágulos infectivos do fungo que se instalam nos pulmões, sendo estes os basidiósporos da fase sexual, ou leveduras dessecadas, dispersos no ambiente. Após a infecção pulmonar o quadro evolui a eventuais focos extrapulmonares de reação tecidual granulomatosa nos hospedeiros imunocompetentes. Estes focos residuais, de infecções latentes, podem ser reativados anos após a infecção inicial, por ocasião de uma imunodepressão celular. Não existem estimativas populacionais amplas de prevalência da infecção por *Cryptococcus* spp. devido à ausência de testes que sejam capazes de mensurar a resposta imune celular tardia, como por exemplo, testes intradérmicos. Entretanto, mediante estudos sorológicos, existe evidência de que a infecção possa ocorrer desde a infância em grande proporção da população urbana. Em Papua-Nova Guiné, uma área endêmica para criptococose por *Cryptococcus gattii* há estudos que demonstram a presença de anticorpos em pacientes direcionados para proteínas deste patógeno.

007. Em alguns casos a criptococose pode mimetizar a tuberculose, com lesões nodulares sem calcificação e eventual cavitação. Outras apresentações incluem massa localizada semelhante à neoplasia e, às vezes, manifesta-se como pneumonia que pode evoluir para insuficiência respiratória aguda.

008. As principais manifestações clínicas da criptococose são relacionadas ao trato respiratório e ao sistema nervoso central (SNC), devido ao tropismo que o fungo tem por este sítio. Até o momento existem três hipóteses para explicar o mecanismo utilizado por *Cryptococcus neoformans* para atravessar a barreira hemato-encefálica. São elas: a transcitose, o mecanismo de Cavallo de Tróia e transferência paracelular. Ainda é desconhecido qual o mecanismo utilizado por

*C. gattii* para a disseminação para o sistema nervoso central. Acredita-se que *C. gattii* seja clinicamente mais virulento do que *C. neoformans*, podendo causar múltiplas lesões nos pulmões e cérebro. As linhagens de *C. gattii* envolvidas em surtos se mostraram mais agressivas e persistentes por um longo período antes da disseminação para o sistema nervoso central.

009. Sendo assim, após a infecção pulmonar inicial (através da inalação de propágulos infectivos do fungo) a criptococose pode acometer outros tecidos, sendo a pele, o sistema osteoarticular, a próstata e os olhos, os locais de relevância para as manifestações clínicas e patogenia da doença. Estas manifestações podem classificar a doença em criptococose pulmonar regressiva, criptococose pulmonar progressiva e criptococose disseminada, formas estas relacionadas com a efetividade da resposta imune do hospedeiro, o tamanho do inóculo e a virulência do microorganismo. Na forma disseminada observa-se o desenvolvimento de infecções cutâneas por formação de pápulas, pústulas ou nódulos subcutâneos. E, raros são os casos de infecção cutânea sem a ocorrência de disseminação para outros órgãos.

010. Na atualidade o diagnóstico laboratorial da criptococose é baseado em três fundamentos: a demonstração da levedura no material clínico; o isolamento em cultura seguido de provas bioquímicas para a identificação final e a pesquisa de antígenos circulantes.

011. A pesquisa direta do fungo pode ser realizada em espécimes como: líquido, escarro, lavado brônquico, pus de lesões cutâneo-mucosas, urina, macerados de tecidos obtidos por biópsia, secreção prostática, sangue e punção de medula óssea. Análises por microscopia óptica de amostras clínicas em presença de tinta nanquim (tinta da China) evidenciam as leveduras capsuladas. Este método é rápido, simples, de baixo custo, mas apresenta sensibilidade de 50% para indivíduos imunocompetentes com meningite criptocócica e 80% em pacientes HIV/AIDS, e não é capaz de distinguir as espécies.

012. A pesquisa de *C. neoformans* em tecidos é feita com corantes específicos como mucicarmim e prata.

013. O cultivo de *Cryptococcus* spp. tem a vantagem de oportunizar a comprovação da doença e, após isolamento da linhagem diferenciar as

espécies, identificar o genótipo e realizar testes de suscetibilidade a antifúngicos. Vários meios de cultivo podem ser utilizados, dentre eles: Ágar-sangue, Ágar-Sabouraud e Ágar infusão de cérebro-coração, sendo que a maioria dos isolados de *Cryptococcus* spp. apresentam crescimento entre 3 e 7 dias. Um teste bioquímico que avalia a habilidade de utilizar a glicina como única fonte de carbono, nitrogênio e resistência a canavanina vem sendo empregado, pois *C. gattii* é resistente a canavanina e utiliza glicina como fonte de carbono, apresentando crescimento com mudança de coloração no ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol - ágar CGB. Uma desvantagem deste método é que somente um crescimento em ágar CGB não é suficiente para fazer a distinção entre as espécies com segurança, devido a relatos de que *C. neoformans* é resistente a altas concentrações de canavanina.

014. A produção de urease e de melanina também são provas bioquímicas utilizadas para a identificação do gênero, pois *C. gattii* e *C. neoformans* são as únicas espécies capazes de realizar hidrólise da uréia e apresentarem coloração marrom em meios de cultura com extratos de sementes como *Vicia faba* ou *Guizottia abyssinica*. Isto se deve à presença, nestas sementes, de tirosina e ácido clorogênico que são oxidados pela fenoloxidase produzida pela levedura.

015. A cultura do LCR é positiva em 89% dos pacientes sem infecção por HIV e em 95%-100% dos pacientes com AIDS. Na criptococose disseminada, hemoculturas que passem pelo procedimento de lise por centrifugação, há uma sensibilidade maior que 70% de criptococemia em pacientes HIV/AIDS. Nos casos de meningoencefalite, a cultura do líquido deve ser repetida sete dias após o início do tratamento e, em seguida, quinzenalmente. As culturas podem permanecer positivas por muito tempo, mesmo na vigência do tratamento.

016. Embora a cultura do microrganismo seja o padrão ouro como método diagnóstico da criptococose, além de ser de grande interesse clínico e epidemiológico, por permitir a diferenciação entre as espécies de *C. gattii* e *C. neoformans*, a recuperação do microrganismo a partir da amostra clínica pode demorar alguns dias, e requer uma grande quantidade de espécime clínico e laboratórios com profissionais treinados e infraestrutura adequada.

017. Outrossim, alguns métodos moleculares têm sido propostos para o diagnóstico e monitoramento de infecções fúngicas, bem como para tipificação dos isolados em estudos epidemiológicos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido a principal ferramenta utilizada no desenvolvimento de protocolos de detecção de DNA de *C. neoformans*, *C. gattii* e de outras leveduras. As variantes do método são a nested PCR, a PCR multiplex e a PCR em tempo real. As técnicas moleculares de tipificação incluem a PCR fingerprinting, onde um locus de polimorfismo no DNA é amplificado gerando diferentes padrões de amplificação. Entretanto, estes testes são de alto custo, laboriosos e de difícil transferência para implantação dessa metodologia na rotina de um laboratório de microbiologia clínica.

018. Ressalta-se ainda que a detecção do antígeno capsular polissacarídeo (GXM) por métodos sorológicos tem sido bastante empregado na rotina laboratorial e clínica.

019. Para tanto, um método sorológico empregado na clínica é detecção de antígeno capsular pela aglutinação com partículas do látex sensibilizadas (LA) com soro de coelho policlonal ou monoclonal anti-capsular do antígeno de *Cryptococcus* spp. Pode ser realizado no soro, urina, lavado bronco alveolar e no líquido cefalorraquidiano (LCR). No entanto, na prática, a detecção de antígeno é feita principalmente no LCR e no soro. Nestes espécimes clínicos são positivos em mais de 90% nos pacientes com meningite criptocócica e em infecções fora do Sistema Nervoso Central (SNC) fornecem menor positividade do teste. Trata-se de um teste acurado, simples, rápido e disponível no mercado, mas que necessita de equipamentos e possui subjetividade na análise do resultado por ser um método que não possui automação. No soro, a presença de fatores reumatóides pode resultar em falsos positivos, entretanto esta desvantagem é reduzida pelo uso de pronase. A sensibilidade é de 95% e especificidade de 98%. Títulos de 1:4 sugerem fortemente a infecção por *Cryptococcus* spp. e títulos  $\geq$  8 sugerem doença em atividade. Este método tem demonstrado boa sensibilidade para detectar antígenos de *Cryptococcus* spp. (CrAg) principalmente em pacientes HIV positivos, quase em sua totalidade, mas demonstra uma sensibilidade mais baixa (74%) quando os pacientes não

são infectados por HIV. O método apresenta percentual de sensibilidade, variando de acordo com a manifestação clínica predominante (56% em pacientes com criptococose pulmonar, 87% em pacientes com criptococose no sistema nervoso central e 67% em pacientes com manifestações em outras regiões). A presença de aglutinação de partículas de látex com títulos > 1:1.024 indica alta carga fúngica, déficit imunitário e quando persistente após 2 semanas do tratamento com títulos >1:512 pode sugerir dificuldade na resposta terapêutica.

020. Com o mesmo intuito, o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foi desenvolvido para detecção automatizada do antígeno capsular de glicuroxilomanana presente no soro de pacientes com criptococose. Apresenta boa sensibilidade e especificidade, pode ser automatizado e fornecer resultados quantitativos. Estudos mostram resultados similares ao látex, com concordância acima de 90%. No entanto este método é mais demorado, requer recurso humano treinado, equipamentos e é mais laborioso.

021. Recentemente foi lançado um novo ensaio imunocromatográfico, conhecido como Lateral-Flow-Immunoassay (LFA). Esta metodologia é baseada na detecção de glicuroxilomanana (GXM) presente na cápsula de *Cryptococcus* spp. dos principais sorotipos (A, B, C, D e do híbrido AD). Pode ser realizado com diversos materiais biológicos, como: soro, líquido, urina, plasma e sangue. Tem-se mostrado um teste muito promissor em soro, apresentando alta sensibilidade (superior a 90%) e alta especificidade (entre 92 a 100%), baixo custo, rápida execução, não necessita de equipamentos, fornece resultados semi-quantitativos e é não laborioso. Sua utilização em urina tem demonstrado ser menos sensível, mas ainda assim apresenta uma sensibilidade acima de 70%.

022. Entretanto, mesmo que os métodos supramencionados cumpram seus objetivos, vale ressaltar que os mesmos adotam metodologia de alta complexidade, além de apresentarem aplicação restrita no diagnóstico clínico, necessitando assim a realização de vários exames distintos, acarretando morosidade no diagnóstico preciso.

023. Imunoensaios desenvolvidos para detectar antígenos ou anticorpos contra *Cryptococcus* spp. são importantes ferramentas para diagnosticar a criptococose. Embora recentes avanços tenham sido feitos na busca de mais disponibilização de testes imunodiagnósticos para criptococose, métodos com alta especificidade e sensibilidade permanecem em desenvolvimento, especialmente na busca de marcadores que sejam capazes de detectar o mais precocemente possível a infecção por este patógeno, já que apresenta significativa morbidade e letalidade quando disseminado para o SNC.

024. Não obstante, versando sobre o estado anterior da técnica, algumas patentes (US5707802, US6180339, US5464743, US7989186, CA2354100, CN103276080A, CN103276081A) reivindicam a propriedade de iniciadores capazes de propiciar um diagnóstico precoce de infecção de *Cryptococcus* spp. Embora tais técnicas assemelhem o sistema proposto na presente invenção, o principal diferencial da patente em epígrafe é a apresentação de novos antígenos potenciais, como alternativa eficaz para um diagnóstico precoce e preciso da criptococose, utilizando conhecimento de imunoproteômica e imunoinformática.

025. Para melhor elucidação da presente invenção segue breve descrição das figuras, elencadas na Figura 1, as quais, ilustram: Proteínas de *Cryptococcus* spp. identificadas por Western blot. Géis bi-dimensionais com proteínas de linhagens de *Cryptococcus* spp. (A) CG01, (B) CG02, (C) CG03 e (D) R265. (E) CG01, (F) CG02, (G) CG03 e (H) R265 são os resultados do Western blot. (I) Resultado do western blot contra soros não infectados por *Cryptococcus* spp.

026. O objeto da presente invenção é praticamente dedicado à identificação, seleção e produção de antígenos por meio de análise proteômica, de bioinformática, síntese de peptídeos e imunoensaio, permitindo a utilização de teste imunodiagnóstico que apresentem boa sensibilidade e especificidade para a criptococose humana, caracterizado pela consecução das etapas discriminadas abaixo:

#### **Etapa 1 - Obtenção de Proteínas**

027. Quatro linhagens de *Cryptococcus gattii* (MYA 4093, CFP 386, CFP 255 e CFP258) foram cultivadas a 37°C em 200 ml de meio YPD (extrato de



levedura a 1%, 2% de peptona, 2% dextrose) (Becton Dickinson, NJ, EUA) durante 24 horas sob agitação a 200 rpm.

028. Antes do processo de extração de proteínas, os cultivos das linhagens supracitadas foram liofilizados e maceradas em nitrogênio líquido. As amostras foram suspensas em tampão de lise com inibidor de protease e detergentes. As proteínas suspensas foram solubilizadas por agitação mecânica em temperatura ambiente durante 5 minutos com intervalo de 1 minuto a 4°C, seguido por centrifugação a 10.000 g durante 20 minutos a uma temperatura de 8°C. O sobrenadante foi recolhido e preservado a -20°C. Os detritos de células remanescentes foram suspensos no mesmo tampão, seguido por agitação em vórtex durante 5 minutos com intervalos de 1 minuto em gelo. O sobrenadante foi recolhido após centrifugação a 10.000 g durante 20 minutos à temperatura de 8°C, reunido com o primeiro sobrenadante e armazenado a -80°C. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford, utilizando uma concentração conhecida de albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

### **Etapas 2 - Electroforese em gel 2D**

029. Amostras contendo 150 µg de proteína foram precipitadas usando 2-D clean-up Kit (GE Healthcare, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante, e solubilizado em 150 µL de tampão IEF (9 M ureia, 4% (p/v) de CHAPS, 1% (p/v) ditiotretitol (DTT) e 0,2% (v/v) anfólitos pH 4-7 (Bio-Rad, CA, EUA), com 0,002% orange G. Em seguida, tiras IPG (gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida) de 7 cm com pH 4-7 (Bio-Rad, CA, EUA) foram reidratadas por 16 a 18 horas. A isoeletrofocalização (IEF) foi realizada utilizando o PROTEAN® Cell (Bio-Rad, CA, EUA) a 20°C nas seguintes condições: 250 V durante 15 minutos, 250-4000 V durante 2 horas, e 4000 V até atingir 10.000 V/h, com um máximo de corrente 50 µA/strip. Tiras IPG focalizadas foram equilibradas durante 15 minutos em tampão de equilíbrio I (30% (v/v) de glicerol, 6 M ureia, 1% DTT, 2% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,375 M de Tris pH 8,8 e 0,002% de azul de bromofenol), e em seguida, 15 minutos em tampão de equilíbrio II (tampão de equilíbrio I, substituindo DTT por 4% de iodoacetamida). SDS-PAGE foi realizado utilizando o método descrito previamente (LAEMMLI,

U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970). As tiras de IPG foram então colocadas sobre um gel de 12% SDS-PAGE, e a eletroforese foi realizada em dois passos, a 10°C: 50 V/gel durante 30 minutos e 100 V/gel até o corante de rastreamento atingir o fundo dos géis. As corridas foram realizadas em um Mini-PROTEAN Tetra Cell Chamber (Bio-Rad, CA, EUA). Os géis foram corados com Coomassie coloidal - CCB G250 (NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v. 9, n. 6, p. 255-62, Jun 1988) e digitalizados com um scanner GS-800TM (Bio-Rad, CA, EUA). Os géis foram transferidos para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) para análise de Western blot.

### **Etapa 3 - Western blot: análise 2DE**

030. Os géis corados e membranas provenientes do Western blot foram digitalizados, e as imagens analisadas pelo programa Image-Master 2D Platinum 6.0® para identificar as proteínas no gel reveladas pelo Western blot, utilizando como referência os marcadores de ponto isoelétrico (pI) e de massa molecular (MM).

031. As imagens das membranas foram analisadas para a seleção dos “spots” considerados imunogênicos, se reconhecidos por soros humanos infectados por *Cryptococcus* spp., excluindo os “spots” não imunogênicos, aqueles que são reconhecidos por soros humanos livres de infecção, estes sendo considerados como reações inespecíficas. Os spots selecionados como imunogênicos foram retirados manualmente dos géis, descorados e digeridos com tripsina para identificação por espectrometria de massas, conforme ilustração figura 1.

### **Etapa 4 - Digestão das Proteínas**

032. Os “spots” imunogênicos (SI) selecionados foram retirados manualmente dos géis. Os SI foram lavados 3 vezes em 100 µl de 50% v/v de acetonitrila (ACN) e 50 mM de bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), durante 15 minutos, seguido por lavagem com 100 µl de ACN. Após a lavagem, os SI foram secos por centrifugação a vácuo e submetidos à digestão com tripsina durante 18-24

horas a 37°C, utilizando-se 20 µl de tripsina a 10 µg/ml, diluída em 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. A extração dos peptídeos foram realizadas duas vezes durante 15 minutos em uma solução de 100 µl composta de 100% ACN e 5% ácido fórmico. Logo após, o material digerido foi concentrado em SpeedVac para volume aproximado de 10 µl e ressuspensão em 10 µl de ácido trifluoroacético a 0,1%.

#### **Etapa 5 - Identificação de proteínas por cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas quadrupolo e tempo de voo em tandem com ionização por eletrospray**

033. Os peptídeos resultantes foram analisados por cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas quadrupolo e tempo de voo em tandem com ionização por electro spray, utilizando um sistema Waters nanoACQUITY UPLCTM acoplado a um espectrômetro de massas Q-TOF Ultima<sup>TM</sup> API. Os peptídeos foram eluídos da coluna de fase reversa, em 10-50% ACN e 0,1% de ácido fórmico em gradiente linear por 30 minutos, a uma taxa de fluxo de 600 nl/min. O levantamento por varredura do MS foi definido para 1 s (0,1 s de atraso entre escaneamentos InterScan) a uma leitura de 200-2000 Da. Os resultados da espectrometria de massas em tandem (MS/MS) foram adquiridos entre 50 e 2000 m/z, e as taxas de escaneamento e entre escaneamento InterScan foram definidos para MS. Para cada varredura, os três ions com cargas mais intensas ao longo de um limiar de oito contagens foram selecionados para análise por MS/MS. A energia de colisão para a fragmentação do peptídeo foi definida usando os arquivos de reconhecimento de carga para +2 e +3 íons de peptídeos, fornecidos pelo MassLynx<sup>TM</sup>. Os dados brutos do MS/MS foram processados pelo Mascot Distiller 2.2.1, software para formar listas de picos aminoácidos.

#### **Etapa 6 - Pesquisas em banco de dados**

034. Os picos para cada "spot" foram analisados pelo software 'MS/MS Ion Search' do Mascot (versão 2.1). Os parâmetros de busca foram: oxidação da metionina, modificação da cisteína por carbamidometilação, clivagem parcial deixando um sítio de clivagem interna, tolerância dos peptídeos à 0,2 Da e tolerância a MS/MS de 0,1 Da. O limite de significância foi fixado em p <0,05, sendo necessário que cada proteína identificada apresentasse pelo menos um

peptídeo com valor de  $p < 0,05$ . Assim, foram comparadas a massa molecular e valores de ponto isoelétrico das proteínas identificadas com os observados no gel 2DE. Todas as sequências de aminoácidos foram obtidas em formato FASTA do banco de dados de proteínas Broad Institute. A ferramenta Blast2GO foi utilizada para obter as categorias funcionais das proteínas. O alinhamento das sequências de aminoácidos (blastp) das proteínas selecionadas foram identificadas por homologia com o banco de dados do National Center for Biotechnology (NCBI).

035. Esse ensaio permitiu identificar 47 proteínas candidatas com potencial para o desenvolvimento de teste diagnóstico para a criptococose. A Tabela 1 mostra 47 proteínas que foram identificadas, sendo que apenas 06 foram utilizadas na composição imunogênica para kit de teste imunodiagnóstico para a criptococose. Inicialmente, a escolha dessas 06 proteínas são baseadas em prévias publicações mostrando o envolvimento dessas proteínas na virulência, resposta imune do hospedeiro, envolvimento no estresse oxidativo associado a virulência, imunoreatividade e por um alto percentual de epítomos para células B.

036. Tabela 1: Proteínas e epítomos de células B mapeados pelos algoritmos ABCPred e BCPreds identificados por Western blot utilizando soro de pacientes com criptococose.

<b>Nome da Proteína</b>	<b>Número GI (NCBI)</b>	<b>Identificação da proteína (a.a)</b>	<b>Western blot da linhagem (s)</b>	<b>Percentagem (%) de epítomos #</b>
Proteína Hipotética Conservada *	321249773	CNBG_1302 222	CG03	47
Proteína Hipotética Conservada *	321258512	CNBG_1079 302	R265	42
Proteína Wos2	321264173	CNBG_3163 225	CG02	41

Proteína microtubulo motor	321252001	CNBG_0115 595	CG01	40
Proteína 40S ribossomal S0	321262430	CNBG_2923 292	CG01, CG03, R265	35
Aconitase	321257755	CNBG_0705 780	CG02	34
Proteína citoplasmática	321251516	CNBG_0282 334	CG03	34
Proteína CAN2	209870972	CNBG_4548 239	CG03	34
Fator de alongamento de Tradução EF1-alpha	321265101	CNBG_4834 459	R265	33
Ubiquinol-citocromo c redutase subunidade ferro-enxofre	321259205	CNBG_4027 281	CG01, CG03	33
Cofilina	321254537	CNBG_3631 138	CG03	33
Celulase	321259223	CNBG_5365 431	CG02	32
Proteína Hipotética Conservada	321248730	CNBG_5509 213	R265	32
Fator de alongação 1-beta	321253797	CNBG_3378 216	CG01, CG03, R265	32
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	321259946	CNBG_1866 336	CG03	31

Proteína Hipotética Conservada	317459873	CNBG_4560 225	R265	31
Proteína Hipotética Conservada	317463621	CNBG_6164 187	CG01, CG03	31
Proteína GrpE *	321263849	CNBG_3060 228	CG01, CG02, R265	30
Nascente do complexo polipeptídico associado a subunidade alpha	321254951	CNBG_4692 191	CG03, R265	30
Proteína citoplasmática	321258406	CNBG_0959 152	R265	30
Sintase ATP subunidade beta	321260596	CNBG_1632 547	CG02, R265	29
Fosfoglicerato mutase	321264207	CNBG_3753 531	CG03	29
Endopeptidase	321250483	CNBG_1355 432	CG02	29
Proteína Ribossomal 40S	321261820	CNBG_2617 199	R265	29
Fator de iniciação 5a	321262683	CNBG_5941 158	CG03, R265	29
Proteína do choque térmico sks2 *	321251600	CNBG_0239 614	R265	28
Proteína citoplasmática	321265253	CNBG_4851 167	R265	28

Succinil-CoA ligado a cadeia beta	321250107	CNBG_1185 418	CG02, CG03, R265	27
Manitol-1-Fosfato desidrogenase	321261427	CNBG_2079 420	CG02	27
Proteína Hipotética Conservada	321251411	CNBG_0290 251	CG01	27
Proteína 14-3-3	317462869	CNBG_5765 256	R265	27
Proteinase carboxi-terminal	321251248	CNBG_0379 168	R265	27
Heat shock protein (Hsp 70) *	321265283	CNBG_4912 756	CG01, CG02, R265	26
Proteína Hipotética	134113905	CNBG_2318 175	CG03	26
Proteína hipotética consevada	321265149	CNBG_4789 135	CG02	26
Dissulfeto-isomerase	321250630	CNBG_0482 408	R265	25
Piruvato desidrogenase e1 componente da sub-unidade beta	321255141	CNBG_4625 407	CG01	25
3-isopropil-Malato desidrogenase	321249266	CNBG_1460 373	CG03, R265	25

Fosfomano- mutase	321261698	CNBG_2499 270	CG03, R265	25
Glutationa transferase	321263388	CNBG_6043 233	CG01	25
Proteína hipotética conservada	405117550	CNBG_0372 291	CG03	24
Ceto-ácido reduto- isomerase	321260128	CNBG_1816 401	R265	23
Proteína Grx5	405118711	CNBG_5485 152	CG03	23
Proteína contendo domínio HHE	405117674	CNBG_0257 221	R265	21
Proteína hipotética conservada	321257508	CNBG_0624 125	CG02	18
Tioredoxin peroxidase tpx1	321261295	CNBG_2132 197	CG01, CG02, R265	17
Hidratase fosfopiruvato (Enolase) *	58264446	CNBG_3703 433	CG01, R265	16

\* Proteínas selecionadas para predição de epítomos de células B e síntese dos peptídeos. (a.a)-  
Aminoácidos

### **Etapa 7 - Predição de epítomos de células B**

037. Para mapear epítomos lineares de células B nas proteínas imunoreativas selecionadas por western blotting foram utilizados dois programas diferentes: ABCPred, o qual baseia-se na máquina de métodos de aprendizagem nos quais se aplicam uma rede neural recorrente, e BCPreds, a qual é também baseada em máquina de métodos de aprendizagem, mas envolve métodos que se aplicam uma máquina de vetor de suporte. Os epítomos que foram identificados in silico pelos dois programas, foram comparados por alinhamento e apenas os



que houveram sobreposição foram considerados antígenos candidatos para o desenvolvimento de imunoenaios para a criptococose. Além disso, foi estabelecido que o tamanho desses peptídeos deveria ser igual ou maior do que 9 aminoácidos.

038. Através da análise in silico foram selecionados 63 peptídeos resultantes da sobreposição dos programas de predição “ABCPred” e “BCPreds” (Tabela 2).

039. Tabela 2: Proteínas selecionadas, número de identificação da sequência (GI) e seus respectivos epítopos de células B selecionados para realização do imunoensaio.

<b>Proteínas</b>	<b>GI</b>	<b>Número de Identificação da Sequência</b>	<b>Peptídeos</b>
Proteína do choque térmico sks2	321251600	SEQ. ID N° 1	EGAIGIDLGTTYSC
		SEQ. ID N° 2	TTPSYVAFTEGERL
		SEQ. ID N° 3	RRYDDADVKKDMKH
		SEQ. ID N° 4	VIDKDGSPYVEVDY
		SEQ. ID N° 5	NEKKTFSPEISAM
		SEQ. ID N° 6	EVLRIINEPTAAAI
		SEQ. ID N° 7	IFDLGGGTFDVSLL
		SEQ. ID N° 8	GDTHLGGEDFDNNL
		SEQ. ID N° 9	HFKAEFKRKTKLDI
		SEQ. ID N° 10	TAFKSTVDPVDKVL
		SEQ. ID N° 11	SINPDEAVAYGAAV
		SEQ. ID N° 12	VLPRNTPIPSNKSR
		SEQ. ID N° 13	PVYEGERTQCKDNR
		SEQ. ID N° 14	GIPPMPRGQAEVC
		SEQ. ID N° 15	DRASGRKAQITIQN
Proteína do choque térmico (Hsp 70)	321265283	SEQ. ID N° 16	PAKTAETSNFKNTI
		SEQ. ID N° 17	RSVNDPEVEEFK
		SEQ. ID N° 18	VDVNGEIGVKVNYL

		SEQ. ID N° 19	VLCSTPPTLPGLNA
		SEQ. ID N° 20	GHSDYSVAVVAFSK
		SEQ. ID N° 21	RHFGGRDFDYALVQ
		SEQ. ID N° 22	FRLTTGCERLKKVL
		SEQ. ID N° 23	QDEAIARGATFACA
		SEQ. ID N° 24	KEAGNPDEDTELVV
		SEQ. ID N° 25	TANPIPSTKVLTFY
		SEQ. ID N° 26	EASYADPATLPKGI
		SEQ. ID N° 27	EEEVTVGEGEAKT
		SEQ. ID N° 28	KKIQRKGDPCVVGQ
		SEQ. ID N° 29	KEALLQGLQEAEDW
		SEQ. ID N° 30	EEGEDASKSAYVQK
		SEQ. ID N° 31	RWKESEERPAAAA
		SEQ. ID N° 32	TYLTAAQGEDEKYS
Proteína GrpE	321263849	SEQ. ID N° 33	MNPRSLTTAVRSFT
		SEQ. ID N° 34	AARTFTPQLQARAY
		SEQ. ID N° 35	RADVQTAVRRSAEE
		SEQ. ID N° 36	TALKHVPQPIPAEN
		SEQ. ID N° 37	LKTFESHGVKKLEN
		SEQ. ID N° 38	AVAPKKDNGEPHGP
Fosfopiruvato hidratase (Enolase)	58264446	SEQ. ID N° 39	TEKGLFRAEVPSGA
		SEQ. ID N° 40	AVELRDKGSDYMGK
		SEQ. ID N° 41	AANVGDEGGFAPNV
		SEQ. ID N° 42	SEFFKDGKYDLDFK
		SEQ. ID N° 43	SIEDPFHEDDFDAW
		SEQ. ID N° 44	SHRSGETESTYIAD
Proteína hipotética conservada	321249773	SEQ. ID N° 45	AKHAVPHSHEKADI
		SEQ. ID N° 46	EHAPKVTPGKENVQ
		SEQ. ID N° 47	DRAVASDDPKDVNP

		SEQ. ID Nº 48	SKKEGKGDKAGEDQ
		SEQ. ID Nº 49	PEAKSGGASANETA
		SEQ. ID Nº 50	QKSANANKGEEKTE
		SEQ. ID Nº 51	KQQGSEEGAPSAQD
		SEQ. ID Nº 52	VTHVMVVGHTGCGG
Proteína hipotética conservada	321258512	SEQ. ID Nº 53	LKKMATEQLENALN
		SEQ. ID Nº 54	GNNNYSSGNNTQGS
		SEQ. ID Nº 55	SQQRVGGNQNQSYG
		SEQ. ID Nº 56	SQNQGYGQQPGGYG
		SEQ. ID Nº 57	GGYGQQENYGGQNQ
		SEQ. ID Nº 58	GGAQYNRPHGQGGGA
		SEQ. ID Nº 59	AANEHNSNGNENSS
		SEQ. ID Nº 60	LSFIGNMNKNDTDI
		SEQ. ID Nº 61	AYGQGNTSGMTSSS
		SEQ. ID Nº 62	AADTSGNKQGGGDM
		SEQ. ID Nº 63	FDSSGGNIQGNKQD

#### **Etapa 8 - Síntese de peptídeos**

040. Os epítomos mapeados de células B foram sintetizados pela empresa Peptides 2.0, com pureza de 98%.

#### **Etapa 9 - Desenvolvimento de Imunoensaio para diagnóstico da Criptococose**

041. Para o desenvolvimento do imunoensaio foram realizados ensaios sorológicos. Para estes ensaios foram utilizados soros de pacientes com infecção por *C. gattii*, *C. neoformans* e soros de indivíduos livres destas infecções. Os peptídeos sintéticos eram a fonte antigênica e o soro dos pacientes com infecção por *Cryptococcus* spp., o anticorpo. Os soros não infectados serviram como controle negativo da reação.

042. Todos os soros foram obtidos a partir de sorotecas. Das amostras de *Cryptococcus* spp., 46 pertenciam à soroteca do Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí LIB/UFPI e 24 foram doados pelo Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais da Faculdade de

Medicina de Botucatu. As 10 amostras livres de infecção também eram provenientes da soroteca do LIB/UFPI.

### **Etapa 10 - Imunoensaio por ELISA**

043. Os peptídeos sintéticos foram testados como antígenos em reação imunoenzimática (ELISA).

044. As placas da marca Falcon® (flexível, de PVC) foram sensibilizadas com os peptídeos sintéticos diluídos (20µg/ml) em tampão bicarbonato pH 9,6, durante aproximadamente 16 horas a 18 horas, a 4o C. Após o bloqueio com solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado e 0,5% de Tween 20, as placas foram incubadas por 1 hora a 37o C. Essas placas foram incubadas com os soros de pacientes com criptococose, em diluição de 1:200, não infectados e infectados por outros patógenos, preparados em PBS pH 7,4 acrescido de 0,5% de leite em pó desnatado e 0,5% de Tween 20, por 1 hora, a 37oC. A ligação dos anticorpos foi detectada usando o anticorpo secundário anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®, MO, EUA) diluídos, preparados utilizando o mesmo diluente descrito para os soros. As placas foram incubadas por 1 hora, a 37o C. Após todas as incubações, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem (PBS pH 7,4 e 0.05% de Tween 20), exceto após o bloqueio, e secas por inversão em papel absorvente. Posteriormente à adição de solução cromógena, obtida pela solubilização de tabletes contendo OPD e peróxido de hidrogênio, foi realizada a incubação das placas por 30 minutos, no escuro, fazendo-se a interrupção da reação adicionando-se solução de ácido sulfúrico a 4N. Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro usando filtro de 492 nm.

045. Exemplo 1: Seleção dos Peptídeos através da Comparação de Soros Positivos e Negativos para a Criptococose: Após o imunoensaio por ELISA contendo os peptídeos sintetizados, foi verificada a diferença de absorbâncias entre soros positivos e negativos para criptococose, com os diversos peptídeos. Assim, foi possível selecionar os 14 peptídeos com maiores diferenças de absorbâncias entre soros positivos e negativos (Tabela 3).

046. **Tabela 3:** Proteínas e seus respectivos peptídeos selecionados com maior diferença de absorbância entre soros positivos e negativos para criptococose.

047. Exemplo 2: Peptídeos Seleccionados através da especificidade e sensibilidade: Com a intenção de testar a especificidade e sensibilidade dos peptídeos, foram realizados novos imunoenaios por ELISA com os 14 peptídeos seleccionados. Cada um desses peptídeos foi testado com diferentes soros humanos individuais, que possuíam anticorpos anti-Cryptococcus, e não infectados (Tabela 4).

048. **Tabela 4:** Peptídeos sintéticos e percentuais de sensibilidade e especificidade contra soros de pacientes com criptococose.

Peptídeos	Sensibilidade %	Especificidade %
VIDKDGSPYVEVDY *	71,40	70
PVYEGERTQCKDNR	81,40	60
VDVNGEIGVKVNYL *	72,80	70
RHFGGRDFDYALVQ *	81,40	80
KEAGNPDEDELVV	58,60	60
EASYADPATLPKGI *	72,80	70
EEEVTVGEGEDAKT	61,40	60
EEGEDASKSAYVQK	62,8	60
TALKHVPQPIPAEN	58,60	70
SIEDPFHEDDFDAW	64,30	70
PEAKSGGASANETA *	70	90
QKSANANKGEEKTE *	60	80
SQNQGYGQQPGGYG	51,40	70
GGYGQQENYGGQNQ	57,10	70

\* Peptídeos seleccionados pela média da sensibilidade e especificidade.

049. Foi possível observar que dos 14 peptídeos seleccionados, 6 apresentaram uma média entre a especificidade e a sensibilidade igual ou superior 70%.

050. Os 6 peptídeos seleccionados, são epítomos das proteínas: Proteína do choque térmico sks2 (1 epítomo), Proteína do choque térmico (Hsp 70) (3 epítomos), Proteína Hipotética conservada (2 epítomos).

051. A Tabela 5 mostra de forma resumida os resultados dos experimentos realizados.

052. **Tabela 5:** Levantamento numérico das proteínas e peptídeos investigados na presente invenção.

<b>Moléculas estudadas</b>	<b>Quantidade</b>
Proteínas identificadas	47
Proteínas mapeadas	6
Peptídeos sintetizados	63
Peptídeos com alta especificidade e sensibilidade	6

053. Destarte, a par destas características, a um processo que descreve a utilização de peptídeos sintéticos imunorreativos para o desenvolvimento de um kit para teste imunodiagnóstico da criptococose, a partir da seleção de peptídeos sintéticos oriundos da identificação de proteínas imunorreativas de *Cryptococcus* spp., por análises proteômicas, e de bioinformática, seguido da síntese de peptídeos e realização de imunoenaios, contendo os requisitos de praticidade, precisão, celeridade e segurança para merecer o privilégio de patente de invenção.

## REIVINDICAÇÕES

1. "PROCESSO", caracterizado por descreve a utilização de peptídeos sintéticos imunorreativos para o desenvolvimento de kit para teste imunodiagnóstico da criptococose, a partir da seleção de peptídeos sintéticos oriundos da identificação de proteínas imunorreativas de *Cryptococcus* spp.
2. "PROCESSO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela identificação, seleção e produção de antígenos por meio de análise proteômica, de bioinformática, síntese de peptídeos e imunoensaio.
3. "PROCESSO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender as seguintes etapas: a) Obtenção de Proteínas; b) Electroforese em gel 2D, c) Western blot: análise 2DE; d) Digestão das Proteínas; e) Identificação de proteínas por cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas quadrupolo e tempo de voo em tandem com ionização por eletrospray; f) Pesquisas em banco de dados; g) Predição de epítomos de células B; h) Síntese de peptídeos; i) Desenvolvimento de Imunoensaio para diagnóstico da Criptococose; e j) Imunoensaio por ELISA.
4. "KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS", caracterizado por permitir a utilização de teste imunodiagnóstico que apresente boa sensibilidade e especificidade para a criptococose humana.
5. "KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS", de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por apresentar novos antígenos potenciais para um diagnóstico precoce e preciso da criptococose, utilizando conhecimento de imunoproteômica e imunoinformática.
6. "KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS", de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compostos imunogênicos para a criptococose, distintos por serem selecionados de um grupo que compreende ao menos uma das proteínas ou peptídeos representados pelos números de identificação das sequências: SEQ. ID Nº 1, SEQ. ID Nº 2, SEQ. ID Nº 3, SEQ. ID Nº 4, SEQ. ID Nº 5, SEQ. ID Nº 6, SEQ. ID Nº 7, SEQ. ID Nº 8, SEQ. ID Nº 9, SEQ. ID Nº 10, SEQ. ID Nº 11,

SEQ. ID Nº 12, SEQ. ID Nº 13, SEQ. ID Nº 14, SEQ. ID Nº 15, SEQ. ID Nº 16, SEQ. ID Nº 17, SEQ. ID Nº 18, SEQ. ID Nº 19, SEQ. ID Nº 20, SEQ. ID Nº 21, SEQ. ID Nº 22, SEQ. ID Nº 23, SEQ. ID Nº 24, SEQ. ID Nº 25, SEQ. ID Nº 26, SEQ. ID Nº 27, SEQ. ID Nº 28, SEQ. ID Nº 29, SEQ. ID Nº 30, SEQ. ID Nº 31, SEQ. ID Nº 32, SEQ. ID Nº 33, SEQ. ID Nº 34, SEQ. ID Nº 35, SEQ. ID Nº 36, SEQ. ID Nº 37, SEQ. ID Nº 38, SEQ. ID Nº 39, SEQ. ID Nº 40, SEQ. ID Nº 41, SEQ. ID Nº 42, SEQ. ID Nº 43, SEQ. ID Nº 44, SEQ. ID Nº 45, SEQ. ID Nº 46, SEQ. ID Nº 47, SEQ. ID Nº 48, SEQ. ID Nº 49, SEQ. ID Nº 50, SEQ. ID Nº 51, SEQ. ID Nº 52, SEQ. ID Nº 53, SEQ. ID Nº 54, SEQ. ID Nº 55, SEQ. ID Nº 56, SEQ. ID Nº 57, SEQ. ID Nº 58, SEQ. ID Nº 59, SEQ. ID Nº 60, SEQ. ID Nº 61, SEQ. ID Nº 62 e SEQ. ID Nº 63.

7. "KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS", de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por compostos imunogênicos para a criptococose, distintos por serem selecionados de um grupo que compreende ao menos uma das proteínas ou peptídeos representados e por gerarem resposta imune celular e/ou humoral.

8. "KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS", de acordo com a reivindicação 4, caracterizados por kit para teste imunodiagnóstico da criptococose, distinto por compreender pelo menos uma das proteínas ou peptídeos representados pelos números de identificação das seqüências SEQ. ID Nº 1, SEQ. ID Nº 2, SEQ. ID Nº 3, SEQ. ID Nº 4, SEQ. ID Nº 5, SEQ. ID Nº 6, SEQ. ID Nº 7, SEQ. ID Nº 8, SEQ. ID Nº 9, SEQ. ID Nº 10, SEQ. ID Nº 11, SEQ. ID Nº 12, SEQ. ID Nº 13, SEQ. ID Nº 14, SEQ. ID Nº 15, SEQ. ID Nº 16, SEQ. ID Nº 17, SEQ. ID Nº 18, SEQ. ID Nº 19, SEQ. ID Nº 20, SEQ. ID Nº 21, SEQ. ID Nº 22, SEQ. ID Nº 23, SEQ. ID Nº 24, SEQ. ID Nº 25, SEQ. ID Nº 26, SEQ. ID Nº 27, SEQ. ID Nº 28, SEQ. ID Nº 29, SEQ. ID Nº 30, SEQ. ID Nº 31, SEQ. ID Nº 32, SEQ. ID Nº 33, SEQ. ID Nº 34, SEQ. ID Nº 35, SEQ. ID Nº 36, SEQ. ID Nº 37, SEQ. ID Nº 38, SEQ. ID Nº 39, SEQ. ID Nº 40, SEQ. ID Nº 41, SEQ. ID Nº 42, SEQ. ID Nº 43, SEQ. ID Nº 44, SEQ. ID Nº 45, SEQ. ID Nº 46, SEQ. ID Nº 47, SEQ. ID Nº 48, SEQ. ID Nº 49, SEQ. ID Nº 50, SEQ. ID Nº 51, SEQ. ID Nº 52, SEQ. ID Nº 53, SEQ. ID Nº 54, SEQ. ID Nº 55, SEQ. ID Nº 56, SEQ. ID Nº 57, SEQ. ID Nº

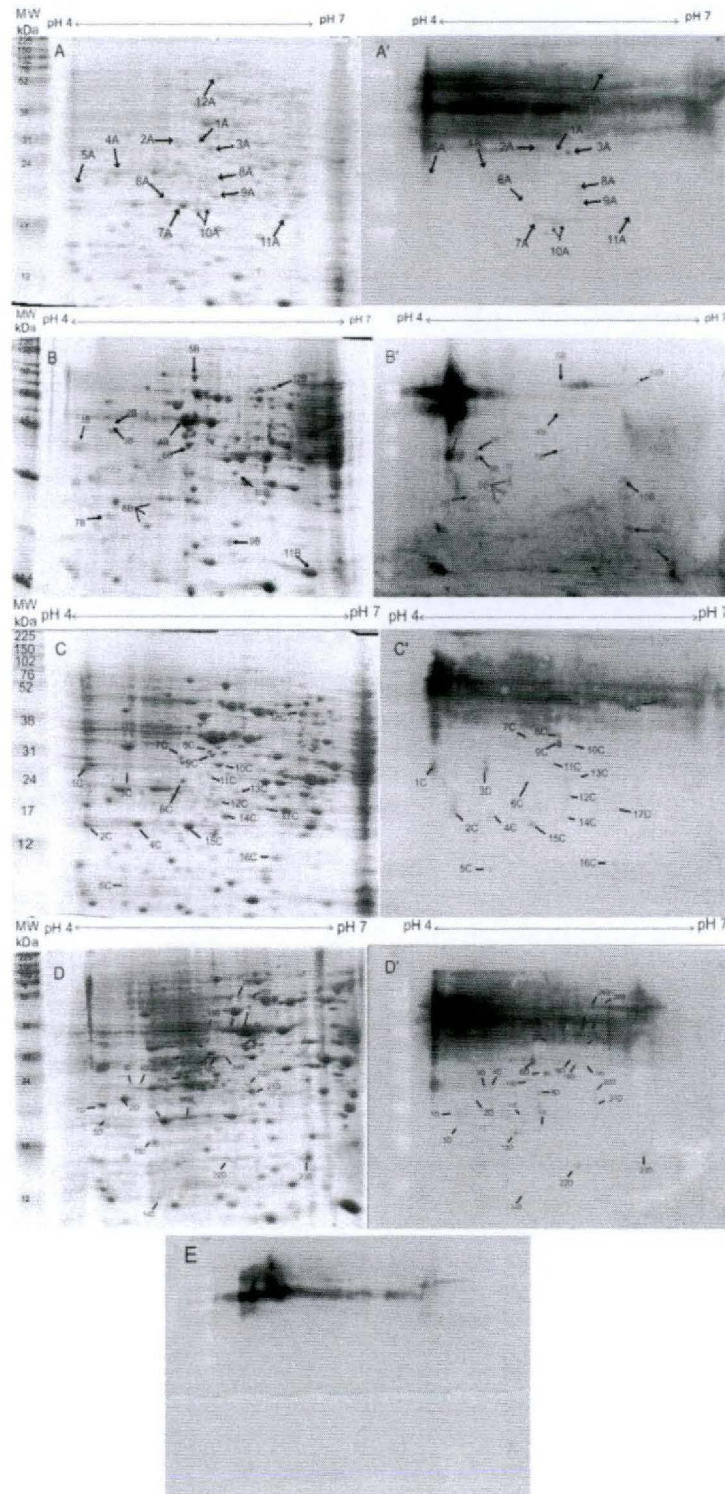


58, SEQ. ID N° 59, SEQ. ID N° 60, SEQ. ID N° 61, SEQ. ID N° 62 e SEQ. ID N° 63, ligados a um suporte.

9. "KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS", de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo suporte ser preferencialmente uma placa de microtitulação para o ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima (ELISA) ou uma membrana.

10. "PROCESSO E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS", de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por utilizar técnicas de imunodiagnóstico selecionadas do grupo compreendendo ELISA, Western blot, Dot blot e Imunocromatografia.

FIGURA 1



## **RESUMO**

### **“PROCESSO E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA CRIPTOCOCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS IMUNORREATIVOS”**

Compreende-se a presente patente de invenção a um processo que descreve a utilização de peptídeos sintéticos imunorreativos para o desenvolvimento de um kit para teste imunodiagnóstico da criptococose, a partir da seleção de peptídeos sintéticos oriundos da identificação de proteínas imunorreativas de *Cryptococcus* spp., por análises proteômicas, e de bioinformática, seguido da síntese de peptídeos e realização de imunoenaios, objetivando seu uso como teste imunodiagnóstico mais eficiente para criptococose humana, tendo em vista a alta especificidade e sensibilidade destes antígenos.

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

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência.txt
- Data de Geração do Código: 05/07/2018
- Hora de Geração do Código: 18:25:41
- Código de Controle:
  - Campo 1: ACD365507826F151
  - Campo 2: 18475F7C5AF82B57