



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014022868-3 A2

(22) Data do Depósito: 16/09/2014

(43) Data da Publicação: 22/03/2016

(RPI 2359)



(54) **Título:** GENE LC36, PROTEÍNA RECOMBINANTE RLC36, USO DA MESMA E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR LEISHMANIOSES, PREFERENCIALMENTE, LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

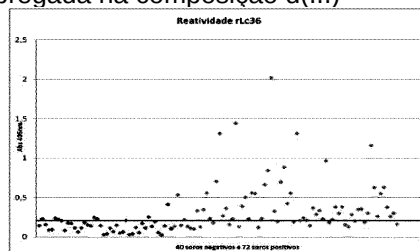
(51) **Int. Cl.:** C12N 15/30; C07K 14/44; A61K 39/008; G01N 33/569; A61P 33/02

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO, FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR

(72) **Inventor(es):** CAMILA TITA NOGUEIRA, MÁRCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA, MAYARA LÚCIA DEL CISTIA, ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO, THAIS FERREIRA ISABEL, HENRIQUE FERREIRA, PAULO INÁCIO DA COSTA, FLÁVIO HENRIQUE DA SILVA

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** GENE LC36, PROTEÍNA RECOMBINANTE RLC36, USO DA MESMA E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR LEISHMANIOSES, PREFERENCIALMENTE, LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA A presente invenção tem por objetivo caracterizar o gene Lc36 de *L. chagasi* quanto ao potencial antigênico, para posterior validação e aplicação do seu respectivo produto, a proteína recombinante rLc36, em teste diagnóstico para leishmanioses, preferencialmente, para leishmaniose visceral canina (LVC). A proteína poderá ser empregada na indústria biotecnológica como componentes de kits diagnósticos para detecção de anticorpos da classe IgG na LVC através de ensaio imunoenzimático. Além do ELISA, os ensaios poderão ser realizados por adsorção da proteína recombinante em outros suportes sólidos e com diferentes sistemas de detecção incluindo teste de aglutinação, imunocromatografia, imunofluorescência, western blot, dot blot e biossensor. A produção de vacinas também poderá ser uma aplicação para esta proteína recombinante. A presente tecnologia poderá ser empregada na composição d(...)



**GENE LC36, PROTEÍNA RECOMBINANTE RLC36, USO DA MESMA E
MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR LEISHMANIOSES, PREFERENCIALMENTE,
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo de aplicação da Química, Farmácia, Microbiologia, Medicina e, mais especificamente, nas áreas de Biotecnologia e Diagnóstico uma vez que se refere ao isolamento e caracterização do gene Lc36, seu produto recombinante - proteína rLc36 e método diagnóstico para leishmanioses, preferencialmente, leishmaniose visceral canina usando a mesma.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) é um parasito protozoário uniflagelado intracelular transmitido para o hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos infectados.

[003] A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar é considerada uma zoonose, sendo o cão o principal reservatório doméstico desse agente. Compreende uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (OMS), encontrando-se ainda entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no Brasil e na América Latina.

[004] A LV pode ser causada por três espécies do parasito: a espécie *Leishmania (Leishmania) donovani*, responsável pela doença na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Quênia, apresenta um perfil antroponótico (transmissão de humanos para humanos);

a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, agente etiológico da LV na Ásia Central e sudoeste, nordeste da China, norte da África e Europa Mediterrânea; e no Novo Mundo; e a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* que apresenta caráter zoonótico e é um dos causadores mais comuns da LV. Estudos enzimáticos e moleculares indicam que *L. chagasi* e *L. infantum* estão proximamente relacionados e, assim, alguns autores consideram *L. chagasi* como sinônimo de *L. infantum*. Como ainda não existe um consenso a respeito deste assunto, optou-se neste pedido pela denominação *L. chagasi* por se tratar de estudo realizado no Brasil.

O parasito

[005] As *Leishmanias* são parasitos intracelulares obrigatórios reproduzindo-se por divisão binária dentro das células do sistema fagocítico mononuclear, em especial macrófagos de mamíferos suscetíveis. Morfologicamente, o gênero *Leishmania* apresenta duas formas durante seu ciclo de desenvolvimento: a) amastigota - forma intracelular presente nos hospedeiros vertebrados e b) promastigota - forma flagelada e móvel, que se desenvolve extracelularmente no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados.

[006] Os vetores, conhecidos por "mosquito-palha", entre outras denominações populares, pertencem à subfamília Phlebotominae, dividida em dois gêneros principais: *Phlebotomus* e *Lutzomya*. Nas Américas, os vetores são do gênero *Lutzomya*, sendo *Lutzomya longipalpis* espécie transmissora da LV. Na Europa, Ásia e África, os vetores são do gênero *Phlebotomus*. Algumas espécies de vetores são

encontradas em florestas, outras são endêmicas de regiões de deserto e algumas, peridomiciliares, residindo próximas a residências urbanas ou áreas rurais.

[007] Os vertebrados que mais comumente albergam *Leishmania spp.* são roedores, marsupiais, endentados, procionídeos, ungulados, primatas e canídeos, sendo alguns considerados reservatórios naturais deste parasito. No ambiente doméstico, o cão é um importante reservatório do agente *L. chagasi*, e é responsável pelo caráter endêmico-epidêmico da doença.

[008] O ciclo de vida deste parasito desenvolve-se quando a fêmea de um flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo, regurgita promastigotas infectantes (formas metacíclicas) na derme do hospedeiro mamífero. Macrófagos são atraídos ao local da picada e ocorre a fagocitose das promastigotas, mediada pelos receptores do complemento, originando o fagolisossomo, onde as promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas. Na ausência do controle parasitário pela célula hospedeira, os parasitos sofrem sucessivas multiplicações por divisão binária simples até que o macrófago infectado sofra lise, liberando as amastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos. O ciclo biológico completa-se quando um inseto pica novamente um hospedeiro contaminado e ingere os macrófagos infectados que acompanham o sangue e/ou linfa intersticial. Durante o trajeto pelo trato digestivo anterior do inseto (ou ao chegarem ao tubo digestivo) os macrófagos rompem-se liberando as amastigotas. Estas formas diferenciam-se em promastigotas não infectivas (forma procíclica), que se multiplicam rapidamente durante a digestão do sangue e a

seguir diferenciam-se em formas metacíclicas livres ou aderidas na porção anterior (proventrículo e faringe) da probóscide do inseto.

Leishmanioses

[009] As leishmanioses apresentam-se sob diferentes formas clínicas: a forma cutânea, podendo ser tegumentar (LC), cutânea-difusa (LDC) ou muco cutânea (LMC) e a forma visceral (LV) ou calazar. Estas diferentes manifestações clínicas são reguladas por propriedades do parasito (infectividade, patogenicidade e virulência) e fatores próprios do hospedeiro (idade, constituição gênica, nutrição e estado imunológico).

Leishmaniose visceral canina (LVC)

[010] No Brasil, a LVC coexiste com a doença humana possuindo, porém, maior prevalência e, via de regra, precede a ocorrência da doença humana.

[011] De modo geral, o quadro clínico se assemelha à doença humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, ocorra aparecimento de lesões de pele. Os cães infectados pela *L. chagasi* podem ser classificados em três formas clínicas: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os assintomáticos são cães com ausência de sinais clínicos característicos de infecção por *Leishmania*. Nos oligossintomáticos ocorrem até três dos sinais clínicos característicos da infecção. Os cães sintomáticos são aqueles que apresentam mais de três sinais clínicos, entre eles, alopecia, dermatite furfurácea, úlceras, hiperqueratose, onicogrifose, emagrecimento, cerato conjuntivite, adenopatia linfoide, opacificação das córneas e opacificação do pelo.

[012] A hipertrofia e a hiperplasia do sistema fagocitário mononuclear, que levam à hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e adenopatia generalizada, são bastante frequentes. Apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema e vômitos são alguns sintomas que podem estar presentes. No entanto, os sinais mais evidentes estão relacionados às alterações cutâneas.

Diagnóstico

[013] Atualmente, os métodos utilizados para o diagnóstico das leishmanioses baseiam-se em aspectos clínicos, demonstração do parasito, sorologia e molecular. É importante considerar o diagnóstico precoce da LV como uma forma de evitar danos mais severos ou até mesmo a morte do paciente.

[014] O diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser realizado devido à inespecificidade de sintomas, que pode ser confundido com outras doenças, tais como brucelose, babesiose, toxoplasmose, entre outras; além de ser perceptível apenas nos casos avançados ou em situações epidêmicas. Os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e específicos, podendo ter reações cruzadas com outras parasitoses.

[015] O diagnóstico de rotina e de certeza baseia-se em métodos diretos, os quais detectam o estágio intracelular do parasito (forma amastigota) por microscopia em tecido de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos; sendo demonstrações no sangue periférico e em cultura, métodos também de rotina. No entanto, estes procedimentos invasivos requerem

microscopista experiente e não fornecem diagnóstico positivo em todos os casos, pois a distribuição dos parasitos nos tecidos afetados não é homogênea.

[016] Técnicas baseadas em análise de DNA estão sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico e caracterização de espécies de *Leishmania*, apresentando um alto nível de acurácia. No entanto, técnicas moleculares ainda dependem de padronização e sua execução tem sido dificultada nos estudos epidemiológicos. Neste sentido, o diagnóstico sorológico permanece como um dos parâmetros laboratoriais mais relevantes em nosso país, embora ainda apresente limitação em seus usos. Entre os diferentes testes disponíveis, os mais amplamente utilizados são: imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação direta (DAT), ensaio imunoenzimático (ELISA), dot-ELISA e *Western blot*.

[017] No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico da LV humana e canina são a RIFI e ELISA, sendo considerado, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais. A RIFI exige, para a sua execução, pessoal treinado, além de ser uma reação dispendiosa e não adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. Além de não ser automatizada, a RIFI necessita de microscópio de fluorescência, consome muito tempo e depende de interpretação subjetiva de microscopista. O DAT é mais adaptável às condições de campo, porém necessita de refrigeração.

[018] Os testes baseados no ELISA, geralmente utilizam parasitos lisados como antígenos, são quantitativos, versáteis e adaptáveis; no entanto,

apresentam muitos problemas relacionados a reações cruzadas, gerando muitos resultados falso-positivos. Testes ELISA baseados em antígenos recombinantes, na tentativa de minimizar estas reações cruzadas têm sido adaptados.

[019] O diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina, pelos testes atualmente disponíveis, apresenta problemas em relação à sensibilidade e especificidade, pois os resultados obtidos mostram-se variáveis, o que compromete o controle da doença em cães e, conseqüentemente, favorece a transmissão desta importante parasitose ao homem. Sendo assim, torna-se necessária a busca de novos antígenos purificados que possam ser utilizados como ferramenta alternativa para detecção de anticorpos específicos contra o parasito, principalmente na população canina infectada assintomática.

[020] A produção de proteínas recombinantes por clonagem e expressão em sistemas procariotos ou eucariotos constitui uma alternativa relevante e efetiva para a preparação de grandes quantidades de antígenos altamente purificados para o uso em testes sorológicos. Essa produção tornou-se uma alternativa também para o diagnóstico da LVC. Diferentes genes de *Leishmania* estão sendo estudados, não apenas para melhor compreensão da biologia do parasito, mas também para obtenção de proteínas que possam ser empregadas em vacinas e em diagnósticos mais sensíveis e específicos para a doença. Um exemplo são as proteínas da família A2 presentes na espécie *L. donovani*, que têm sido utilizadas em testes sorológicos e têm se mostrado imunogênicas e específicas ao estágio amastigota do parasito estágio responsável pela manutenção da doença no hospedeiro

mamífero.

[021] A pesquisa de novos componentes antigênicos purificados que possam ser utilizados como ferramenta para obtenção de um diagnóstico alternativo, pode assegurar maior sensibilidade e especificidade aos testes. Vários antígenos foram identificados e testados: rGBP, rORFF, rK9/rK26, rK39 e rK28. Destes, o antígeno rK39 mostrou-se o mais sensível no diagnóstico da LV humana. Entretanto, testes rápidos utilizando esta proteína recombinante como antígeno mostraram-se mais adequados para o diagnóstico de casos de LVC sintomáticos, apresentando pouca sensibilidade em cães assintomáticos. Enquanto testes sorológicos empregando a proteína recombinante rK39 são mais eficientes na detecção de anticorpos em animais sintomáticos, as proteínas recombinantes rK26 e A2 parecem ser eficientes no diagnóstico sorológico tanto em cães sintomáticos quanto em cães assintomáticos.

[022] A tecnologia aqui descrita relaciona-se ao produto de um fragmento do gene Lc36 de *L. chagasi* o qual não apresenta similaridade com sequências das espécies *L. major* e *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Toxoplasma gondii* e *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, com a finalidade de minimizar reações cruzadas. Um fragmento do gene Lc36 foi clonado no vetor de expressão pET28a, expresso e purificado para caracterização antigênica. Esta invenção visa fornecer um método para diagnóstico mais sensível e mais específico que os testes atualmente disponíveis no mercado para diagnóstico de leishmaniose visceral em cães suspeitos de estarem infectados com o parasito *L. chagasi*.

ESTADO DA TÉCNICA

[023] Atualmente existem dois kits diagnósticos disponíveis para leishmaniose visceral canina: EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Biomanguinhos (EIE-LVC) e IFI-Leishmaniose-Canina-Biomanguinhos (IFI-LVC), sendo este último considerado padrão-ouro pelo Ministério da Saúde, portaria nº 1943 (Doenças de Notificação obrigatória em todo território Nacional).

[024] Diversos estudos relatam a necessidade de associar os dois testes para obter maiores sensibilidade e especificidade, uma vez que os mesmos geram muitos resultados falsos positivos, o que culmina na eutanásia de animais saudáveis, e falsos negativos, o que dificulta o controle da população canina contaminada.

[025] É de extrema necessidade que kits diagnósticos mais confiáveis para leishmanioses sejam disponibilizados no mercado, uma vez que os testes atualmente utilizados para detecção de soros positivos apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade, o que compromete o controle da doença e favorece sua transmissão.

[026] O fragmento proteico rLc36, por ser codificado pelo gene Lc36, presente no genoma de *L. chagasi*, minimiza o risco de obtenção de resultados falsos positivos nos testes sorológicos, que são decorrentes da presença de outros parasitos, como *T. cruzi*, por exemplo.

[027] A presente invenção compreende um método de diagnóstico de leishmaniose canina por imunoensaio baseado na detecção de anticorpos que reconhecem o antígeno rLc36. Os imunoensaios baseiam-se na detecção de anticorpos que

reconhecem o antígeno no soro de cães infectados e visam suprir a demanda de testes com maior sensibilidade e especificidade para esta finalidade. A tecnologia apresenta o critério de aplicação industrial, por estar apta a ser produzida ou utilizada no setor industrial, no caso, na fabricação de kit diagnóstico para *Leishmania*. A literatura descreve inúmeros imunoenaios para detecção de várias formas de *Leishmania*. No entanto, nenhum dos documentos descreve a utilização do antígeno rLc36 para tal.

Objetivos e vantagens da invenção

[028] A presente invenção tem por objetivo isolar e caracterizar o gene Lc36 de *L. chagasi* quanto ao potencial antigênico, para posterior validação e aplicação do seu respectivo produto, a proteína recombinante rLc36, em método diagnóstico para leishmanioses, preferencialmente, leishmaniose visceral canina (LVC).

[029] A proteína poderá ser empregada na indústria biotecnológica como componentes de kits diagnósticos para detecção de anticorpos da classe IgG na LVC através de ensaio imunoenzimático. Além do ELISA, Os ensaios poderão ser realizados por adsorção da proteína recombinante em outros suportes sólidos e com diferentes sistemas de detecção incluindo teste de aglutinação, imunocromatografia, imunofluorescência, *western blot*, *dot blot* e biossensor. A produção de vacinas também poderá ser uma aplicação para esta proteína recombinante. A presente tecnologia poderá ser empregada na composição de um novo kit diagnóstico para LVC, mais sensível e específico do que as tecnologias atualmente disponíveis.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[030] A presente invenção refere-se ao isolamento e caracterização de um gene específico de *Leishmania*, chamado Lc36 e seu produto recombinante (uma proteína chamada de rLc36) como um possível antígeno para um novo teste diagnóstico para leishmanioses, preferencialmente, leishmaniose visceral canina (LVC). Um fragmento do gene Lc36 foi amplificado com oligonucleotídeos específicos, clonado em vetor de expressão pET28a e expresso em *Escherichia coli* linhagem BL21 DE3. Em seguida, a proteína recombinante rLc36 obtida foi purificada por afinidade em coluna de níquel por uma cauda de poli histidinas e confirmada por *western blot*. Diferentes concentrações da proteína foram testadas por ELISA usando soros de cães infectados com leishmaniose visceral e de cães saudáveis. A concentração da proteína recombinante de 0,1 ug/ml - 10 ug/ml foi detectada em testes de ELISA, e reagiu contra soros de cães infectados com LVC diluídos de 1/50 - 1/800 em testes preliminares com resultado de 71% de sensibilidade e 85% de especificidade, utilizando se um painel de 112 soros de cães (40 negativos e 72 positivos para LVC).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[031] A Figura 1 mostra o produto de indução purificado e processado de *E. coli* BL21 (DE3) pET28aLc_36, indução a 30 °C, (FS) fração solúvel e (FI) fração insolúvel.

[032] A Figura 2 representa graficamente a reatividade dos soros positivos e negativos para LVC testados na diluição de 1/50-1/800 perante a concentração

de 0,1 ug/ml - 10 ug/ml da proteína rLc36, com 60 minutos de incubação. Os pontos vermelhos correspondem aos soros positivos enquanto os azuis aos soros negativos. A linha verde na horizontal representa o valor do *cut off* para 95,0% de confiança e cujo valor corresponde a 0,208.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[033] A presente invenção descreve o isolamento e a caracterização do gene Lc36, cuja sequência nucleotídica do fragmento selecionado está representada na SEQ ID NO 1 que codifica para a proteína recombinante rLc36, cuja sequência proteica selecionada está representada na SEQ ID NO 2.

[034] A proteína recombinante rLc36 pode ser utilizada como antígeno na produção de vacinas e na composição de um novo kit diagnóstico para leishmanioses, mais sensível e específico do que as tecnologias atualmente disponíveis.

[035] A invenção aqui descrita fornece um método para diagnosticar leishmanioses, preferencialmente, leishmaniose visceral canina e compreende:

a) utilização de um fragmento da proteína rLc36 como antígeno;

b) identificação da doença a partir de amostras biológicas de animais infectados por *L. chagasi*, onde as amostras biológicas contêm anticorpos que se ligam à proteína recombinante rLc36.

[036] Esta tecnologia pode ser utilizada na detecção das leishmanioses canina e humana por meio de testes imunoenzimáticos, bem como na construção de metodologias que utilizam outros suportes sólidos tais como

testes de aglutinação, biossensores, imunocromatografia, imunofluorescência, *western* e *dot blot*.

[037] O método diagnóstico descrito avalia se a amostra de soros de cães apresenta anticorpos anti *Leishmania* através da presença do antígeno, no caso a proteína rLc36, e um conjugado anti-cão para detecção do complexo antígeno - anticorpo. A proteína antigênica rLc36 está ligada a uma fase sólida. De preferência o antígeno pode ser outras porções da proteína Lc36, ou a proteína inteira.

[038] A proteína em questão, por se codificada pelo fragmento proteico rLc36, do gene Lc36, presente no genoma de *L. chagasi*, minimiza o risco de obtenção de resultados falsos positivos nos testes sorológicos, que são decorrentes da presença de outros parasitos, como *T. cruzi*, por exemplo.

PROCEDIMENTOS

Análise de bioinformática

[039] Genes específicos de *L. chagasi*, ou seja, aqueles que não apresentavam homólogos nas demais espécies de *Leishmania* foram analisados quanto à possibilidade de codificarem proteínas com potencial antigênico para o desenvolvimento de novos testes sorológicos para diagnóstico da LVC.

[040] Para análise de bioinformática, as sequências nucleotídicas e proteicas *L. chagasi* - específicas foram obtidas a partir do banco de dados de domínio público GeneDB. As sequências foram analisadas quanto a:

[041] Similaridade das sequências de interesse através do programa "BLAST" (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (National Center of Biotechnology Information) contra banco de dados de sequências não redundantes (nr) do GeneBank ou banco de dados parasito específicos (*L. major*, *L. braziliensis* e *T. cruzi*);

[042] Presença de domínios TR através do programa *Tandem Repeat Finder*. Os genes que codificam para as proteínas de interesse foram analisados quanto à presença de TRs, domínios geralmente reconhecidos pelos linfócitos B;

[043] Hidropaticidade (determinação de regiões hidrofílicas), presença de domínios transmembrana, ponto isoelétrico e peso molecular;

[044] Presença de epítomos reconhecidos pelos linfócitos B utilizando-se o banco de dados IEDB *Analysis Resource*.

[045] Após consulta aos bancos de dados, o gene selecionado foi o Lc36.

Desenho de oligonucleotídeos iniciadores

[046] Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos foram desenhados com o auxílio do programa *Gene Runner*® (versão 3.01) para avaliar eventual formação de estruturas secundárias (*hairpins*, *loops internos* e *duplexes*). Os oligonucleotídeos diretos (contendo o sítio de restrição *NcoI*) e reversos (contendo o sítio de restrição *HindIII*) foram desenhados de modo a garantir manutenção da fase aberta de leitura da ORF (*open reading frame*) para posterior clonagem no vetor de expressão pET28a (Tabela 1).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de interesse

Oligonucleotídeos	Sequência (5' - 3')	Sítio de restrição
Lc36	AAA <u>CCA TGG</u> GGC GAA TCG ACT CCT CTT GTG	<i>NcoI</i>
Lc36	TTT <u>AAG CTT</u> GTC CAC CTG CTC CTC GGC CG	<i>HindIII</i>

[047] O DNA genômico de células promastigotas de *L. chagasi* foi extraído, purificado e quantificado. Os produtos purificados foram clonados em vetor de expressão pET28a e após transformação bacteriana em *E. coli* linhagem BL21 DE3, foram selecionadas colônias para preparo de pré-inóculos e posterior extração de DNA plasmidial (miniprep). Concluída a miniprep, realizou-se digestão nos sítios de restrição adequados (*NcoI* e *HindIII*) para confirmação dos clones recombinantes obtidos.

[048] Após digestão, realizou-se eletroforese em gel de agarose 1% para separar os fragmentos gerados pela digestão enzimática. As bandas de interesse foram excisadas do gel sob iluminação UV de comprimento de onda longo com auxílio de bisturi e procedeu-se a purificação dos fragmentos.

[049] Os clones recombinantes obtidos através de miniprep foram sequenciados com o objetivo de se avaliar a fase de leitura correta das construções antes do início da expressão das proteínas recombinantes. Para isso eles foram quantificados em espectrofotômetro e a partir das quantidades de DNA obtidas foram calculadas as quantidades necessárias para cada amostra. As análises dos resultados

obtidos foram realizadas com programa BioEdit e revisadas com o programa SeqScape v.2.7 (Applied Biosystems by Life Technologies®).

[050] Em seguida, a proteína recombinante rLc36, fusionada à cauda de poli histidinas, foi purificada por afinidade em coluna de níquel e confirmada por *western blot*.

[051] A Figura 1 mostra o resultado dos ensaios de *western blot* da proteína purificada, após indução de *E. coli* BL21 (DE3) pET28aLc36 em um intervalo de 20 a 40 °C. As lavagens da coluna de níquel com soluções de imidazol (200 mM, 80 mM, 40 mM e 20 mM) mostrando a fase solúvel (FS) da purificação e o pellet (P) correspondente à fase insolúvel (FI) com corpos de inclusão da proteína. Tal resultado confirma a presença da proteína recombinante fusionada à cauda de histidinas, revelada pelo anticorpo primário Monoclonal Anti-poli Histidina (Sigma-Aldrich - H1029), confirmando sua identidade e mostra que rLc36 está presente em grande quantidade na fração insolúvel da amostra purificada. Como pode ser observado, a proteína rLc36 está presente também em quantidade significativa na fração solúvel; assim, foi possível iniciar os testes de antigenicidade com a mesma. *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-rad) foi o peso molecular utilizado e o peso molecular da rLc36 é 28,4 kDa.

[052] Diferentes concentrações da proteína foram testadas por *ELISA* usando soros de cães infectados com leishmaniose visceral e de cães saudáveis. A concentração da proteína recombinante de 0,1 ug/ml - 10 ug/ml foi detectada em testes de *ELISA*, e reagiu contra soros de cães

infectados com LVC diluídos a de 1/50 - 1/800 em testes preliminares, com resultado de 71% de sensibilidade e 85% de especificidade, utilizando-se um painel de 112 soros de cães (40 negativos e 72 positivos para LVC).

[053] A Figura 2 mostra o gráfico da reatividade obtido perante o painel de 112 soros de cães, em que os pontos azuis representam os soros negativos (40) e os pontos vermelhos, os soros positivos (72), enquanto a linha verde horizontal representa o *cut off* de 0.208 para um índice de confiança de 95.0% usando 20 soros negativos.

REIVINDICAÇÕES

1. Gene Lc36 **CARACTERIZADO** por compreender a sequência nucleotídica do fragmento selecionado na SEQ ID NO 1.

2. Proteína recombinante rLc36 **CARACTERIZADA** por ser codificada pelo gene Lc36, conforme definido na reivindicação 1, e compreender sequência proteica selecionada na SEQ ID NO 2.

3. Uso da proteína recombinante rLc36, conforme definida na reivindicação 2, **CARACTERIZADA** por ser como antígeno para a produção de vacinas ou na composição de um kit diagnóstico para leishmanioses.

4. Método diagnóstico para leishmanioses, preferencialmente, leishmaniose visceral canina **CARACTERIZADO** por compreender:

a) uso de um fragmento da proteína rLc36, conforme definido na reivindicação 3;

b) identificação da doença a partir de amostras biológicas de animais infectados por *L. chagasi* contendo anticorpos que se ligam à proteína recombinante rLc36.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** por na etapa a) o antígeno ser um fragmento da proteína Lc36 ou a proteína inteira.

6. Método, de acordo com as reivindicações 4 ou 5, **CARACTERIZADO** por ser realizado por meio de testes imunoenzimáticos, bem como na construção de metodologias que utilizam outros suportes sólidos tais como testes de aglutinação, biossensores, imunocromatografia, imunofluorescência, *western* e *dot blot*.

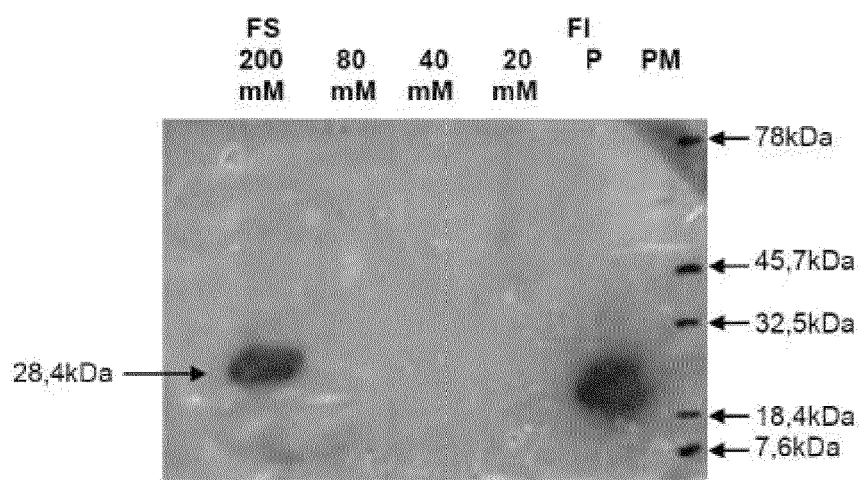


Figura 1

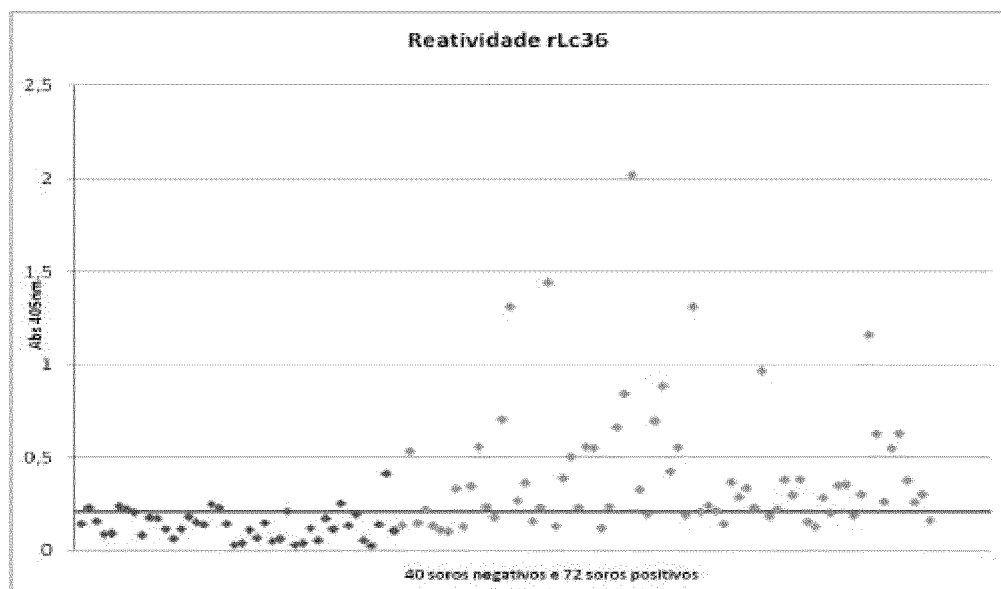


Figura 2

RESUMO**GENE LC36, PROTEÍNA RECOMBINANTE RLC36, USO DA MESMA E
MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR LEISHMANIOSES, PREFERENCIALMENTE,
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

A presente invenção tem por objetivo caracterizar o gene Lc36 de *L. chagasi* quanto ao potencial antigênico, para posterior validação e aplicação do seu respectivo produto, a proteína recombinante rLc36, em teste diagnóstico para leishmanioses, preferencialmente, para leishmaniose visceral canina(LVC). A proteína poderá ser empregada na indústria biotecnológica como componentes de kits diagnósticos para detecção de anticorpos da classe IgG na LVC através de ensaio imunoenzimático. Além do ELISA, os ensaios poderão ser realizados por adsorção da proteína recombinante em outros suportes sólidos e com diferentes sistemas de detecção incluindo teste de aglutinação, imunocromatografia, imunofluorescência, *western blot*, *dot blot* e biossensor. A produção de vacinas também poderá ser uma aplicação para esta proteína recombinante. A presente tecnologia poderá ser empregada na composição de um novo kit diagnóstico para LVC, mais sensível e específico do que as tecnologias atualmente disponíveis.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



E79D791F9942326A

Campo 2



F54489236F8BBC4D

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Untitled2_ST25.txt
- Data de Geração do Código: 11-09-2014
- Hora de Geração do Código: 16:03:07
- Código de Controle:
 - Campo 1: E79D791F9942326A
 - Campo 2: F54489236F8BBC4D

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

<120> GENE LC36, PROTEÍNA RECOMBINANTE RLC36, USO DA MESMA E MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR LEISHMANIOSES, PREFERENCIALMENTE, LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

<130> 14AUIN029

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 768

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência nucleotídica selecionada para clonagem do gene Lc36

<400> 1

atggggcgaa tcgactcctc ttgtgtcgct gccacggtga cgcctagcaa ggtcggcgca	60
tcgtcgtctt gtcccggcac ggcgacaagc actggcaaga tagacgagcc tgcttctcgc	120
gccgctgccc cgcagggccg ggcgcagcga tgtggccgag cgcgaccgc ccagatgcac	180
aacagcctca gtgcggggat gtgtgataac caacagcagc acgccgcagg cgtttggaag	240
ttgattgcag ggccgcagag cgctccacg actccgcgc cgctcgtgat gggtgacggc	300
acaggcggcg aggatcatgc gcaggctgcc cacaccggcg tccggtggac taagcacgcg	360
tgggaaaagg gcaacgactg ccctgcgggt agcgcgtacg ggtcttttgt aggcgcgccg	420
ctgcgcaggc tgccgccaac gcctccgttc cctggtgtgc gtcttcccgc ctggtgtcgg	480
tccgcgtcgg cgacggcgta tccgcctccg aggatggcct caciaacgag ctgctggact	540
tcttctatta tctgcagttg acctcccatg aggaagcggc acgggagcgg ctgcttggct	600
acgtgcaggc gtgcgtggcg aagttgtggg gcccctgtaa acggggagcg aagccgaggg	660
aacagcacag gtgatgctgt acggcagcta cgctctaggg ctttctcttc caagcagcga	720

cattgatctt gccctgactt tcccggccga ggagcaggtg gacgtcgc

768

<210> 2

<211> 255

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência protéica selecionada do gene Lc36

<400> 2

Met Gly Arg Ile Asp Ser Ser Cys Val Ala Ala Thr Val Thr Pro Ser
1 5 10 15

Lys Val Gly Ala Ser Ser Ser Cys Pro Gly Thr Ala Thr Ser Thr Gly
20 25 30

Lys Ile Asp Glu Pro Ala Ser Arg Ala Ala Ala Pro Gln Gly Arg Ala
35 40 45

Gln Arg Cys Gly Arg Ala Arg Pro Ala Gln Met His Asn Ser Leu Ser
50 55 60

Ala Gly Met Cys Asp Asn Gln Gln Gln His Ala Ala Gly Val Trp Lys
65 70 75 80

Leu Ile Ala Gly Pro Gln Ser Ala Ser Thr Thr Pro Pro Pro Leu Val
85 90 95

Met Gly Asp Gly Thr Gly Gly Glu Asp His Ala Gln Ala Ala His Thr
100 105 110

Gly Val Arg Trp Thr Lys His Ala Trp Glu Lys Gly Asn Asp Cys Pro
115 120 125

Ala Gly Ser Ala Tyr Gly Ser Phe Val Gly Ala Pro Leu Arg Arg Leu
130 135 140

Pro Pro Thr Pro Pro Phe Pro Gly Val Arg Leu Pro Ala Trp Cys Arg
 145 150 155 160

Ser Ala Ser Ala Thr Ala Tyr Pro Leu Ser Glu Asp Gly Leu Thr Asn
 165 170 175

Glu Leu Leu Asp Phe Phe Tyr Tyr Leu Gln Leu Thr Ser His Glu Glu
 180 185 190

Ala Ala Arg Glu Arg Leu Leu Gly Tyr Val Gln Ala Cys Val Ala Lys
 195 200 205

Leu Trp Gly Pro Cys Lys Pro Gly Ser Glu Ala Glu Gly Thr Ala Gln
 210 215 220

Val Met Leu Tyr Gly Ser Tyr Ala Leu Gly Leu Ser Leu Pro Ser Ser
 225 230 235 240

Asp Ile Asp Leu Ala Leu Thr Phe Pro Ala Glu Glu Gln Val Asp
 245 250 255