



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102016025687-9

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102016025687-9

(22) Data do Depósito: 03/11/2016

(43) Data da Publicação Nacional: 29/05/2018

(51) Classificação Internacional: C07K 16/14; G01N 33/569.

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL PARA DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE E USOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 17217985000104. Endereço: AV. ANTÔNIO CARLOS, 6627 - UNIDADE ADMINISTRATIVA II - 2º ANDAR-SALA 2011, Belo Horizonte, MG, BRASIL(BR), 31270-901, Brasileira; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA XV DE NOVEMBRO, 1299, BAIRRO CENTRO, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80060-000, Brasileira; CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLOGICOS - CPPI, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 76416866000140. Endereço: RUA PIQUIRI, 170, BAIRRO REBOUÇAS, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80230-140, Brasileira

(72) Inventor: LUÍS FELIPE MINOZZO FIGUEIREDO; CARLOS DELFIN CHÁVEZ OLÓRTEGUI; JOÃO CARLOS MINOZZO; LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA.

Código de Controle: 400B6071BE49BBCD 5CF6158E19F27FA8

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 03/11/2016, observadas as condições legais

Expedida em: 23/02/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Í ANTICORPO MONOCLONAL PARA DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE E USOSÍ

[01] A presente invenção refere-se à sequência aminoacídica de um fragmento variável de cadeia simples (scFv) como parte de um anticorpo monoclonal anti-gp43. A gp43 é uma glicoproteína presente no fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. O anticorpo monoclonal, constituído da molécula scFv, é capaz de identificar especificamente a gp43 do *P. brasiliensis* em fluidos biológicos. Essa molécula poderá ser particularmente usada no diagnóstico laboratorial e específico de pacientes que sofrem da paracoccidiodomicose (PCM), a mais importante micose profunda existente na América Latina e no Brasil, causada pelos fungos dimórficos *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Ademais, o anticorpo monoclonal ou sua molécula scFv podem ser usados como reagentes na purificação da proteína gp43, e/ou para identificar ou mapear sequências antigênicas imunodominantes na proteína específica do fungo.

[02] A paracoccidiodomicose (PCM) é a mais importante micose profunda existente na América Latina, causada pelos fungos dimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. É também denominada blastomicose sul-americana, doença Lutz-Splendore-Almeida, granulomatose paracoccidióidica, granuloma paracoccidióidico, granulomatose blastomicóide tropical e granuloma ganglionar de origem blastomicótica.

[03] Devido ao seu potencial incapacitante e às complicações que podem levar ao óbito, essa micose representa um importante problema de Saúde Pública, atingindo principalmente segmentos específicos da sociedade, cujas profissões e atividades envolvem manejo do solo, provável reservatório do agente. A maioria dos acometidos possui entre 30 e 50 anos de idade e é do sexo masculino, devido à proteção natural feminina promovida pela ação do hormônio 17-b-estradiol (Ministério da Saúde,

2010, Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso, 444 p; Palmeiro, M., K. Cherubini, and L. S. Yurgel, 2005, Paracoccidioidomicose - Revisão de Literatura: Scientia Medica, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, p. 5; Shikanai-Yasuda, M. A., F. e. Q. Telles Filho, R. P. Mendes, A. L. Colombo, and M. L. Moretti, 2006, [Guidelines in paracoccidioidomycosis]: Rev Soc Bras Med Trop, v. 39, p. 297-310).

[04] A doença existe sob duas formas: a aguda/subaguda, conhecida também por tipo juvenil, que predomina em crianças e adolescentes, mas pode acometer indivíduos até os 35 anos de idade; e a crônica ou tipo adulto, que se desenvolve principalmente em adultos do sexo masculino, com faixa etária entre 30 e 60 anos (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

[05] As áreas endêmicas situam-se em regiões de florestas tropicais ou subtropicais. O Brasil possui o maior número de casos descritos da doença, seguido pela Colômbia, Venezuela e Guatemala. Com distribuição regional heterogênea, prevalece principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e região Amazônica. O aumento de incidência nos estados das regiões Centro-Oeste e Norte está associado ao avanço da fronteira agrícola (Góes, A. M., L. S. Santos, S. A. Araújo, S. G. Cruz, W. C. Siqueira, and E. R. P. Pedroso, 2014, Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): etiologia, epidemiologia e patogênese: Revista Médica de Minas Gerais, v. 24, p. 61-66).

[06] A PCM não é objeto de vigilância epidemiológica nacional, mas em alguns estados brasileiros, ela integra o quadro de doenças de notificação compulsória (Ministério da Saúde, 2010). A enfermidade faz parte da lista de doenças negligenciadas, cujo impacto na saúde pública não foi quantificado devido à falta de dados. Por não ser de notificação compulsória, os cálculos de prevalência, incidência e morbidade baseiam-se em relatos de inquéritos epidemiológicos e séries de casos. Acredita-se

que sua incidência em zonas endêmicas varie de 3 a 4 novos casos por milhão até 1 a 3 novos casos por 100 mil habitantes ao ano (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

[07] No Brasil, a PCM é a micose que causa maior número de óbitos (Ministério da Saúde, 2010). A PCM foi apontada como a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa predominantemente crônica entre as doenças infecciosas e parasitárias. Foram registrados 3.181 casos de óbito por PCM entre 1980 e 1995, o que resultou em uma taxa de mortalidade de 1,45 por milhão de habitantes (Shikanai-Yasuda et al., 2006). Entre 1996 e 2006 houve 3.583 óbitos por micoses sistêmicas no Brasil, sendo que a PCM foi a mais frequentemente mencionada (667 óbitos). Os maiores índices de mortalidade foram encontrados nas regiões Sudeste e Sul, principalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, sendo que as maiores taxas foram encontradas nos dois primeiros estados. Diferentemente de outras micoses sistêmicas, a associação de PCM com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é baixa, com 84 mortes (1,4%) entre 1998 e 2006 (Prado, M., d. Sil, M. B. va, R. Laurenti, L. R. Travassos, and C. P. Taborda, 2009, Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006: Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, p. 513-521). Mesmo assim, é considerada como condição definidora de AIDS (Ministério da Saúde, 2010).

[08] Um dos componentes mais antigênicos do antígeno de *P. brasiliensis* é a glicoproteína de 43 kDa (gp43) (Puccia, R., S. Schenkman, P. A. J. Gorin, and L. R. Travassos, 1986, EXOCYLLULAR COMPONENTS OF PARACOCCIDIOIDES-BRASILIENSIS - IDENTIFICATION OF A SPECIFIC ANTIGEN: Infection and Immunity, v. 53, p. 199-206). Sua sequência apresenta aproximadamente 50% de identidade com exoglucanases de

Saccharomyces cerevisiae e *Candida albicans*, mas gp43 não apresenta atividade de glucanase, devido a uma mutação no sítio catalítico conservado nessas enzimas (NKP) (Cisalpino, P. S., R. Puccia, L. M. Yamauchi, M. I. Cano, J. F. da Silveira, and L. R. Travassos, 1996, Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: *J Biol Chem*, v. 271, p. 4553-60). A virulência de uma linhagem de *P. brasiliensis* não está necessariamente relacionada à expressão e secreção de gp43, visto que na linhagem agressiva Pb12 ela é menos expressa (Carvalho, K. C., L. Ganiko, W. L. Batista, F. V. Morais, E. R. Marques, G. H. Goldman, M. F. Franco, and R. Puccia, 2005, Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype: *Microbes Infect*, v. 7, p. 55-65). Também foi observado que não há alteração na curva de crescimento, vitalidade celular e morfologia devido à redução na expressão dessa proteína (Torres, I., O. Hernandez, D. Tamayo, J. F. Muñoz, N. P. Leitão, A. M. García, A. Restrepo, R. Puccia, and J. G. McEwen, 2013, Inhibition of PbGP43 expression may suggest that gp43 is a virulence factor in *Paracoccidioides brasiliensis*: *PLoS One*, v. 8, p. e68434).

[09] *P. lutzii* possui uma proteína ortóloga à gp43 de *P. brasiliensis* (pl entre 6,8 e 8,5), chamada plp43, que possui massa molecular predita de 42 kDa e pl de 9,4, e mostra importantes alterações de aminoácidos. Por isso, nenhum dos anticorpos monoclonais anti-gp43 descritos no estado da técnica são capazes de reconhecer essa proteína. O sítio catalítico NEP de plp43 está conservado, o que foi comprovado pela atividade de glucanase da enzima. No entanto, o sítio de glicosilação está mutado para KRT, por isso a proteína não é glicosilada. Existe pelo menos um motivo de ligação à fibronectina de gp43 conservado em plp43. Os soros de pacientes que reconheceram gp43 (glicosilada ou não) reconheceram plp43, o que sugere epítopos em comum. Entretanto, evidências sugerem que ela seja pouco

expressa em *P. lutzii* (Leitão, N. P., M. C. Vallejo, P. M. Conceição, Z. P. Camargo, R. Hahn, and R. Puccia, 2014, Paracoccidioides lutzii Plp43 is an active glucanase with partial antigenic identity with *P. brasiliensis* gp43: PLoS Negl Trop Dis, v. 8, p. e3111).

[010] O padrão ouro para o diagnóstico de PCM é o encontro de elementos fúngicos sugestivos de *P. brasiliensis* em exame a fresco de escarro ou outro espécime clínico (raspado de lesão, aspirado de linfonodos) e/ou fragmento de biopsia de órgão acometido (Shikanai-Yasuda et al., 2006). Esses métodos são limitados, devido ao acesso restrito a amostras de órgãos internos e ao fato de que a identificação do fungo nem sempre é viável, devido aos tratamentos prévios (Perenha-Viana, M. C., I. A. Gonzales, S. R. Brockelt, L. N. Machado, and T. I. Svidzinski, 2012, Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis through a Western blot technique: Clin Vaccine Immunol, v. 19, p. 616-9).

[011] O diagnóstico diferencial deve ser realizado com as outras doenças que compõem a síndrome verrucosa (tuberculose, esporotriose, histoplasmose em imunodeprimidos, leishmaniose tegumentar americana, cromomicose) e sífilis. Nas formas linfáticas, deve-se diferenciar do linfoma de Hodgkin, tuberculose ganglionar e outras neoplasias (Ministério da Saúde, 2010).

[012] Na análise microscópica de secreções (trato respiratório, nasal, oral, naso-faringe), leveduras globosas ou multiformes de parede espessa e inclusões citoplasmáticas com múltiplos brotamentos são indícios de infecção com *P. brasiliensis*, o que também caracteriza o fungo em amostras de tecidos, pus e aspirados (subcutâneo, ganglionar, cerebral, pulmonar, mucosa ou outro) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2013, Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação dos fungos de importância médica: Brasília, Brasil., Anvisa, 47 p).

[013] Uma análise comparativa de acurácia foi realizada com os procedimentos de rotina realizados para o diagnóstico da PCM em um Hospital Universitário, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual de São Paulo . UNESP, Brasil. O ensaio com a maior sensibilidade foi a análise histopatológica (66,7%), seguida pela imunodifusão dupla (90%), e depois valores similares entre ensaio citopatológico e análise micológica direta, a qual gerou 74,5% de sensibilidade com diferentes tipos de tecido e 62,5% com amostras de escarro (Moreto, T. C., M. E. Marques, M. L. de Oliveira, D. V. Moris, L. R. de Carvalho, and R. P. Mendes, 2011, Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital: Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 105, p. 473-8).

[014] A análise e o acompanhamento sorológico de pacientes com PCM é realizada por alguns centros de referência que utilizam diferentes preparações antigênicas e protocolos. A maioria dos centros usa técnicas de imunoprecipitação semi-quantitativas, como imunodifusão dupla ou contra-imunoelétroforese. Todos os centros exibiram altas taxas de discordâncias principais (que podem levar a diferenças no tratamento clínico), com média de 20%. Quando o %core+ dado pelo seu centro de origem foi comparado com os %cores+ dos demais centros, novamente o número de discordâncias principais foi elevado, chegando a 49% dos valores de discordância com pelo menos um centro, o que sugere que um ensaio diagnóstico para PCM deva ser padronizado, levando em consideração o tipo de antígeno (espécie única ou pool), técnica empregada e a presença de *P. lutzii* (Vidal, M. S., G. M. Del Negro, A. P. Vicentini, T. I. Svidzinski, M. J. Mendes-Giannini, A. M. Almeida, R. Martinez, Z. P. de Camargo, C. P. Taborda, and G. Benard, 2014, Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: high rate of inter-laboratorial variability among medical mycology reference centers: PLoS

Negl Trop Dis, v. 8, p. e3174). Por ser um fungo resistente e de difícil eliminação, a rápida detecção e o tratamento precoce são decisivos para evitar efeitos deletérios e suas consequências (Teles, F. R., and M. L. Martins, 2011, Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis: Talanta, v. 85, p. 2254-64).

[015] Devido à impossibilidade de erradicação de *P. brasiliensis*, os pacientes apresentam um risco potencial de reativação tardia, razão pela qual se aplica o termo %ura aparente ou cura clínica+. O tratamento diminui a quantidade de fungos no organismo, permitindo a recuperação da imunidade celular e o reestabelecimento do equilíbrio entre parasito e hospedeiro. Portanto, como existe a possibilidade de recidiva da doença, os pacientes devem ser acompanhados ambulatorialmente, com exame clínico e sorológico, após a interrupção do tratamento. Um resultado positivo obtido por imunodifusão dupla pode indicar retorno da doença, situação na qual se justifica a reintrodução da terapêutica (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

[016] Gp43 foi caracterizada como o principal componente antigênico de *P. brasiliensis*. As preparações antigênicas derivadas de culturas cujos intervalos de cultivo se diferem usualmente apresentam diferenças na composição dos componentes predominantes (Puccia et al., 1986). Existe heterogeneidade no padrão de reatividade frente aos componentes do exoantígeno total de *P. brasiliensis* entre os soros de pacientes (Casotto, M., 1990, Characterization of the cellular antigens of Paracoccidioides brasiliensis yeast form: J Clin Microbiol, v. 28, p. 1188-93; Puccia, R., and L. R. Travassos, 1991, 43-kilodalton glycoprotein from Paracoccidioides brasiliensis: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease: J Clin Microbiol, v. 29, p. 1610-5). No entanto, parece haver um direcionamento da produção de anticorpos contra a porção C-terminal de gp43 (Diniz, S. N.,

K. C. Carvalho, P. S. Cisalpino, J. F. Silveira, L. R. Travassos, and R. Puccia, 2002, Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of the recombinant fusion proteins: Clin Diagn Lab Immunol, v. 9, p. 1200-4).

[017] O soro de pacientes com histoplasmose, candidíase e aspergilose pode reconhecer algumas proteínas do antígeno de *P. brasiliensis*, assim como o soro de pacientes com PCM pode reagir com抗ígenos de outras enfermidades (Casotto, 1990; De Camargo, Z., C. Unterkircher, S. P. Campoy, and L. R. Travassos, 1988, Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests: J Clin Microbiol, v. 26, p. 2147-51). As reações cruzadas se devem a interação com epítocos glicosilados, como demonstrado pela redução na reatividade após deglicosilação de gp43 (Puccia and Travassos, 1991).

[018] Anticorpos monoclonais (mAb) anti-gp43 já foram caracterizados anteriormente, reconhecendo especificadamente essa proteína, sem grandes perdas de reatividade pela competição com alguns carboidratos (Gesztesi, J. L., R. Puccia, L. R. Travassos, A. P. Vicentini, J. Z. de Moraes, M. F. Franco, and J. D. Lopes, 1996, Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis: Hybridoma, v. 15, p. 415-22; Puccia, R., and L. R. Travassos, 1991, The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis: Arch Biochem Biophys, v. 289, p. 298-302). Um deles (mAb 17c) foi selecionado para utilização em um imunoensaio enzimático de captura, no qual a placa era sensibilizada com o anticorpo monoclonal, que em seguida era incubado com gp43. Então, os soros dos pacientes eram incubados em diferentes diluições, que depois eram reconhecidos por anticorpos conjugados anti-humano. Soros de pacientes com histoplasmose, doença

de Jorge Lobo, candidíase, aspergilose e soros de pacientes sadios reagiram por ELISA tradicional e imunoensaio de captura, mas os soros de pacientes com paracoccidioidomicose reagiram com maior intensidade. O ensaio se mostrou mais sensível que a imunodifusão dupla e mais específico que o ELISA tradicional (Camargo, Z. P., J. L. Gesztesi, E. C. Saraiva, C. P. Taborda, A. P. Vicentini, and J. D. Lopes, 1994, Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis: *J Clin Microbiol*, v. 32, p. 2377-81).

[019] Recentemente, o mAb 17c foi utilizado em um ensaio de aglutinação ligado a partículas de látex (mAb-17c-SLPs). O mesmo procedimento foi realizado ligando a molécula de gp43 nas partículas (gp43-SLPs). Desse modo, dois métodos de diagnóstico rápido foram propostos: um para detectar a presença de anticorpos anti-gp43 no soro de pacientes usando gp43-SLPs, e outro para detectar o antígeno solúvel no soro usando mAb17c-SLPs, o qual tem relevância nos casos de pacientes imunocomprometidos com PCM. O primeiro ensaio detectou anticorpos em 98% das amostras de soro, mas exibiu algumas reações cruzadas com soro de histoplasmose (16,6%), aspergilose (11,11%) e candidíase (7,7%), mas a sensibilidade e especificidade foram de 98,46% e 93,94%, respectivamente. Já o ensaio para detectar a molécula de antígeno circulante foi capaz de reagir com 96,9% das amostras de soro. No entanto, ocorreram reações cruzadas com soros de histoplasmose (27,7%), aspergilose (22,2%) e candidíase (23%). Da mesma forma, a sensibilidade e especificidade do ensaio foram de 96,92% e 88,89%, respectivamente. Contudo, os ensaios também podem ser realizados com amostras de fluido cerebroespinal e lavado brônquio-alveolar, gerando valores de sensibilidade e especificidade elevados (Dos Santos, P. O., A. M. Rodrigues, G. F. Fernandes, S. H. da Silva, E. Burger, and Z. P. de

Camargo, 2015, Immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* using a latex test: detection of specific antibody anti-gp43 and specific antigen gp43: PLoS Negl Trop Dis, v. 9, p. e0003516).

[020] Anticorpos monoclonais anti-Gp43 podem aumentar a taxa de fagocitose de células de *P. brasiliensis* opsonizadas com mAbs pela indução de citocinas, sendo mais evidente na presença de IFN-, sem que tenha ocorrido polarização de resposta Th1 ou Th2 com o tratamento. O anticorpo com efeitos mais significativos foi o mAb 3E, o qual reconhece o epítopo NHVRIPIGYWAV (Buissa-Filho, R., R. Puccia, A. F. Marques, F. A. Pinto, J. E. Muñoz, J. D. Nosanchuk, L. R. Travassos, and C. P. Taborda, 2008, The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus: Infect Immun, v. 76, p. 3321-8).

[021] Os anticorpos monoclonais 17c, 24a e 8a foram utilizados para criação de anticorpos anti-idiotipo (AB2) e anticorpo anti-anti-idiotipo (Ab3). A partir de camundongos imunizados com o mAb 17c gerou-se outro mAb 7.B12, o qual foi capaz de detectar a presença de anticorpo anti-gp43 no soro de pacientes em um ensaio imunoenzimático. Outro formato de ensaio imunoenzimático foi realizado para detectar a produção de anticorpos anti-idiotipo (AB2) no soro de pacientes, usando uma mistura dos mAb 17c e 8a adsorvidos na placa (Souza, A. R., J. L. Gesztesi, J. Z. Moraes, C. R. Cruz, J. Sato, M. Mariano, and J. D. Lopes, 1998, Evidence of idotypic modulation in the immune response to gp43, the major antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in both mice and humans: Clin Exp Immunol, v. 114, p. 40-8).

[022] A glicoproteína de 70 kDa (gp70) também foi explorada como alvo para produção de anticorpos monoclonais. Essa proteína está presente no

meio intracelular de *P. brasiliensis*, e influencia a fagocitose através do receptor Fc. Além disso, Gp70 inibe a produção basal de óxido nítrico em macrófagos peritoneais não ativados, e inibe também a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais, ativados ou não. Um mAb foi capaz de reduzir o número de unidades formadoras de colônia nos pulmões, mas a redução foi maior quando este foi combinado a um segundo anticorpo (de Mattos Grosso, D., S. R. de Almeida, M. Mariano, and J. D. Lopes, 2003, Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis: Infect Immun, v. 71, p. 6534-42).

[023] No intuito de identificar outro antígeno de interesse sorológico para diagnóstico, outros anticorpos monoclonais foram gerados, dessa vez contra uma glicoproteína de 58 kDa de *P. brasiliensis*, a qual era detectada após 24 horas de cultura, mostrando ser secretada e detectada também pelo soro de alguns pacientes com PCM (Figueroa, J. I., A. J. Hamilton, M. H. Allen, and R. J. Hay, 1995, Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 kDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera: Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 89, p. 566-72).

[024] Os fragmentos variáveis de cadeia simples (scFv) foram utilizados para induzir proteção contra infecção experimental em camundongos. Para isso, células dendríticas foram transfectadas com um plasmídeo que codificava um scFv de um anticorpo anti-idiotípico (mAb 7.B12), que inibe a ligação de Gp43 ao mAb 17C, sugerindo que o mAb anti-idiotípico ligue ao idiotopo. As células dendríticas transfectadas promoveram a proliferação de células dos linfonodos de camundongos após injeção intramuscular. Além disso, o grupo que recebeu células transfectadas apresentou redução significativa no número de unidades formadoras de colônia presentes nos pulmões, o que sugeriu que uma ativação eficiente de célula-T (Ferreira, K.

S., A. Q. Maranhão, M. C. Garcia, M. M. Brígido, S. S. Santos, J. D. Lopes, and S. R. Almeida, 2011, Dendritic cells transfected with scFv from Mab 7.B12 mimicking original antigen gp43 induces protection against experimental Paracoccidioidomycosis: PLoS One, v. 6, p. e15935). Ademais, a imunização de camundongos com um vetor codificando o scFv do mAb 7.B12 (pMAC/PS-scFv) sugeriu que células apresentadoras de antígeno (APCs) são capazes de reconhecer o scFv no músculo e migrar para linfonodos regionais, induzindo o aumento de células CD11c+/CD8+ e CD11c+/CD40, assim como a proliferação de células T CD4+ e CD8+. Contudo, a transfecção de células dendríticas com o vetor vazio pMAC/PS ou pMAC/PS-scFv gerou resultados similares, provavelmente devido à indução de uma resposta imune não-específica. Já as células transfectadas com pMAC/PS-scFv induziram a expressão de dectin-1, Myd88 e TLR2 na iniciação da resposta imune inata. A ativação de células T depende da produção de citocinas. Camundongos infectados tratados com pMAC/PS-scFv mostraram uma mistura de resposta imune Th1/Th2. Nos pulmões, houve decréscimo de IFN-, IL-12 e IL-4, enquanto houve aumento dessas citocinas nos linfonodos regionais. A resposta imune humoral induzida pelas células dendríticas com pMAC/PS-scFv mostrou aumento na proporção IgG2a em relação a IgG1 contra gp43. O scFv do mAb 7.B12 possui a seguinte sequência aminoacídica:

MTLNMLLGLKWVFFVVFYQGVHCARVKLVES
 GEGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDFAMSWVRQTPEKRLEWVAYISSAGS
 YIDYA.DTVKGRFTISRDNARDTLYLQMTSLKSEDTAIYYCIRDGHYGSTSH
 WYFDVWGT.GTTVTVSSRGGGSGGGGGSDLQIVLTQSPAIMSAS
 LGERVTMTCTATSS
 VSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSASNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISS
 MEAE
 DAATYYCHQYHRSPPTFGGGTKLEIKHHHHHHGDPKADNKFNKEQQNA

FYEIL

HPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQKLKVPPSSNSS
RPAR PDPDMIRYIDEFGQTTTRMQ (Jannuzzi et al., 2015), que se difere da sequência presente no anticorpo monoclonal proposto na presente invenção.

[025] O documento de patente PI 1103659-1, intitulado %Processo de obtenção de anticorpo monoclonal específico utilizado em kit de imunodiagnóstico aplicado na detecção precoce da ferrugem asiática da soja causada especificadamente pelo fungo *Phakopsora pachyrizi* e anticorpo monoclonal resultante+, descreve um kit imunodiagnóstico de anticorpo monoclonal para identificação precoce da doença, e se difere da presente invenção, por tratar-se de outra sequência aminoacídica.

[026] O documento de patente US6818748, intitulado %Cloning, expression, sequencing, and functional enhancement of monoclonal scFv antibody against Venezuelan equine encephalitis vírus (VEE)+ descreve um fragmento variável de cadeia simples (scFv) gerado a partir de um anticorpo monoclonal (mAb) contra o vírus da encefalite equina venezuelana (VEE) por clonagem dos genes das regiões variáveis das cadeias pesada (VH) e leve (VL) do anticorpo, apresentando reatividade comparável ao mAb parental no reconhecimento do antígeno VEE. Essa tecnologia se difere da presente invenção, por apresentar outra sequência aminoacídica.

[027] O documento de patente WO2006119897, intitulado %Fusion protein of antibody L19 against fibronectin ed-b and interleukin 12+, refere-se a um conjugado para direcionamento do agente terapêutico ou diagnóstico ou de drogas para as células ou tecidos no corpo, por exemplo, áreas de crescimento neoplásico ou angiogênese. compreendendo um membro de ligação específica, como um fragmento de anticorpo tal como um scFv. O conjugado pode compreender heterodímero de IL-12 possuindo duas subunidades, cada subunidade fundida ao scFv L19 ou TN11. Tal

tecnologia apresenta sequência aminoacídica diferente da presente invenção

[028] O documento de patente PI0802672-6, intitulado "%Anticorpo monoclonal, composição farmacêutica, processo de preparação de anticorpo monoclonal, hibridoma, kit de diagnóstico de esporotricose, método de diagnóstico de esporotricose e método de tratamento de esporotricose+", refere-se a um anticorpo monoclonal, designado como P6E7, que se liga especificadamente ao antígeno glicoproteico de 70 kDa, secretado pelo fungo *Sporothrix schenckii*, bem como ao processo de preparação deste anticorpo monoclonal, através da produção de um hibridoma entre células mielomatosas e células esplênicas de animais imunizados com o antígeno de 70 kDa. Este anticorpo pode ser ainda utilizado em uma composição farmacêutica, um kit de diagnóstico, um método de diagnóstico e um método de tratamento para a esporotricose. Essa tecnologia se difere da presente invenção, por apresentar uma sequência aminoacídica diferente.

[029] Não foram encontradas evidências de uma molécula de scFv voltada para o diagnóstico da PCM no estado da técnica. O scFv existente tem intuito de induzir proteção *in vivo* contra a progressão da doença. Mais ainda, não existe molécula desse tipo conjugada voltada para essa enfermidade. A molécula de scFv proposta na presente invenção poderá ser expressa fusionada com a enzima fosfatase alcalina, gerando um reconhecimento específico de gp43 oriundo do anticorpo monoclonal que deu origem a essa molécula e ao mesmo tempo permitindo a imediata detecção da reação. A expressão heteróloga em sistema procarioto ou eucarioto inferior pode resolver o problema de rendimento da cultura de células animais *in vitro*, com menos custo do que o inerente do escalonamento do cultivo de hibridomas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[030] A **figura 1** representa os resultados do teste ELISA de reatividade cruzada com o mAb 2A7C5. A microplaca foi sensibilizada com uma solução dos抗ígenos a 40 g/mL ou de gp43 a 3,5 g/mL em *coating buffer*, *overnight* a 4°C. Em seguida, os sobrenadantes de cada um dos poços foram incubados durante 1 hora a 37°C. Após incubação do anticorpo anti-camundongo HRP (1:4000), a reação foi desenvolvida com OPD durante 20 minutos. As absorbâncias foram medidas a 490 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata.

[031] A **figura 2** representa o Western blot e SDS-PAGE dos抗ígenos fúngicos frente ao mAb 2A7C5 e soro policlonal de coelho. 10 g de cada抗ígeno e 2 g de gp43 purificada foram analisados em gel de poliacrilamida 12,5%. St . padrão de massa molecular; Pb . exoantígeno de *P. brasiliensis*; gp43 . gp43 purificada por cromatografia de afinidade com coluna de anticorpo anti-gp43 policlonal de coelho; C.a .抗ígeno de *C. albicans*; A.f .抗ígeno de *A. fumigatus*; A.n .抗ígeno de *A. niger*; H.c .抗ígeno de *H. capsulatum*; C.n .抗ígeno de *C. neoformans*; M.t .抗ígeno de *M. tuberculosis* e L.b .抗ígeno de *L. braziliensis*. Após transferência para membrana de nitrocelulose, os sobrenadantes do mAb 2A7C5 (A e B), do mAb 4E9F6 (C e D) e soro policlonal de coelho anti-gp43 (E) foram incubados por 1 h e 30 min. Após incubação com o anticorpo conjugado HRP adequado, as membranas foram reveladas por DAB/cloronaftol (A, C, E) ou quimioluminescência (ECL) (B, D). F . perfil proteico dos抗ígenos utilizados com coloração por prata.

[032] A **figura 3** representa o resultado do *Spot-synthesis* para identificação de epítópos lineares dos mAb. A membrana contendo 126 pentadecapeptídeos da sequência foi bloqueada *overnight* com o tampão de saturação, e então incubada com diferentes concentrações de mAb

2A7C5 ou soro policlonal de coelho anti-gp43 (1:1000) por 90 minutos. Após lavagens, a membrana foi incubada com anti-IgG de camundongo ou de coelho conjugado à fosfatase alcalina (1:3000). A revelação foi realizada com solução de BCIP/MTT por 30minutos. A) membrana incubada com mAb 2A7C5 40 g/mL; B) mAb 2A7C5 45 g/mL; C) mAb 2A7C5 50 g/mL; D) mAb 2A7C5 100 g/mL; E) soro policlonal de coelho anti-gp43; F) Incubada somente com conjugado anti-IgG de camundongo (controle). Vermelho: spots 81 a 83; verde: spots 6 a 9; laranja: spots 35, 65 e 66.

[033] A **figura 4** representa a modelagem tridimensional de gp43 e a localização do possível epítopo do mAb 2A7C5. Modelo tridimensional de gp43, gerado através da ferramenta iterativa I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). A) Representação com estruturas secundárias da molécula. B) Representação de esferas da molécula. Em vermelho, o peptídeo consenso dos spots 81 a 83; em azul, o peptídeo consenso dos spots 6 a 9; em amarelo, o peptídeo do spot 35; e em magenta, o peptídeo consenso dos spots 65 e 66.

[034] A **figura 5** representa a purificação de gp43 através da imunocromatografia com coluna de mAb 4E9F6. O exoantígeno de *P. brasiliensis* foi incubado com a coluna de proteína G sepharose/mAb 4E9F6. Após lavagem, o antígeno ligado foi eluído por redução de pH com glicina 0,1 M pH 2,7. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, corado pelo método de prata. 1 . 8: frações coletadas durante a purificação; St: padrão de massa molecular.

[035] A **figura 6** representa os ELISAs para detecção de imunoglobulinas anti-gp43 no soro de pacientes. A) A microplaca foi sensibilizada com uma solução de gp43 purificada por imunocromatografia usando mAb 4E9F6 a 3,5 g/mL em *coating buffer*, *overnight* à 4°C. Em seguida, os soros dos pacientes (1:400) foram incubados durante 1 hora à 37°C. Após incubação do anticorpo específico anti-fração Fc humana (1:10.000), a reação foi

desenvolvida com OPD durante 15 minutos. B) A microplaca foi sensibilizada com uma solução de mAb 4E9F6 250ng/mL em *coating buffer*, *overnight* à 4°C. Após bloqueio, gp43 purificada por imunocromatografia usando mAb 4E9F6 foi adicionada a 300 ng/mL. Em seguida, os soros dos pacientes, diluídos a 1:4000, foram incubados durante 1 hora a 37°C. Após incubação do anticorpo específico anti-fração Fc humana (1:10.000), a reação foi desenvolvida com OPD durante 15 minutos. As absorbâncias foram medidas a 490 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Soros de pacientes sem histórico de doença (CN 1-9), soros de pacientes com aspergilose (Asp 1-6) e com histoplasmose (CPPI 2/23 Hist.) foram utilizados para avaliar a especificidade do ensaio. Os soros CP 1-9 são soros de pacientes com PCM confirmada pela primeira vez, os soros indicados CPPI com diferentes numerações são soros de pacientes com baixa reatividade por ensaio de imunodifusão dupla (considerados curados+), e as demais abreviações (WC, HRF, JFRS, MES, IGLC, IC, RES, FSC, JBS, CTP, AMS) são pacientes sob tratamento ou com recidiva da doença.

[036] A **figura 7** representa estrutura de %olar de pérolas+do mAb 2A7C5, apresentada por ferramenta iterativa <http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest> para análise das sequências das cadeias leve e pesadas dos mAbs.

[037] A **figura 8** representa a sequência aminoacídica e nucleotídica do scFv do mAb 2A7C5. A) Sequência otimizada para expressão em *Escherichia coli*. B) Sequência otimizada para expressão em *Pichia pastoris*. As sequências originais da cadeia leve (VL) e pesada (VH) foram analisadas pela ferramenta iterativa do IMGT <http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest>. A sequência do peptídeo juncional %inker+ está sublinhada, enquanto que as regiões determinantes

de complementaridade (CDR) de ambas as cadeias VL e VH estão indicadas em cinza.

[038] A **figura 9** representa o esquema de clonagem dos genes que codificam o scFv fusionado à fosfatase alcalina. A) Construção do inserto do gene sintético otimizado utilizando o vetor pET-26b para expressão em *Escherichia coli*. B) Construção do inserto do gene sintético otimizado utilizando o vetor pPICZ-alphaB para expressão em *Pichia pastoris*. Os sítios de restrição das enzimas escolhidas estão sublinhados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

[039] A presente invenção refere-se à sequência aminoacídica de um fragmento variável de cadeia simples (scFv) como parte de um anticorpo monoclonal anti-gp43. A gp43 é uma glicoproteína presente no fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. O anticorpo monoclonal, constituído da molécula scFv, é capaz de identificar especificamente a gp43 do *P. brasiliensis* em fluidos biológicos. Essa molécula poderá ser particularmente usada no diagnóstico laboratorial e específico de pacientes que sofrem da paracoccidioidomicose (PCM), a mais importante micose profunda existente na América Latina e no Brasil, causada pelos fungos dimórficos *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Ademais, o anticorpo monoclonal ou sua molécula scFv podem ser usados como reagentes na purificação da proteína gp43, e/ou para identificar ou mapear sequências antigênicas imunodominantes na proteína específica do fungo.

[040] Mais especificamente, a presente invenção trata de anticorpo monoclonal anti gp43, compreendendo a sequência aminoacídica definida pela SEQ ID No 1. Opcionalmente, tal anticorpo monoclonal pode estar associado à enzima fosfatase alcalina.

[041] O anticorpo monoclonal proposto na presente invenção pode ser usado no diagnóstico da paracoccidioidomicose.

[042] O método para diagnóstico da paracoccidioidomicose utilizando o anticorpo monoclonal proposto na presente invenção pode ser selecionado do grupo compreendendo ELISA, Western blot, Dot blot, imunodifusão, imunocromatografia ou outro método que permita a utilização do anticorpo monoclonal da presente invenção.

[043] Um método, não limitante da tecnologia, para o sorodiagnóstico da paracoccidioidomicose, caracteriza-se por compreender as seguintes etapas:

- a. Exposição de uma amostra ao anticorpo monoclonal contendo a sequência aminoacídica definida pela SEQ ID No1 ligado a um suporte sólido ou a um carreador;
- b. Adição de um anticorpo ou uma proteína, que estejam conjugados a uma enzima ou a um marcador e que se liguem à gap 43 da amostra da etapa (a);
- c. Detecção da proteína gp43 específica para paracoccidioidomicose na amostra citada na etapa (a), utilizando-se reagentes capazes de detectar a enzima ou o marcador citados na etapa (b).

[044] Opcionalmente, o anticorpo monoclonal proposto na presente invenção poderá estar conjugado à enzima fosfatase alcalina, eliminando-se a etapa %~~a~~.

[045] Na etapa %~~a~~, a amostra pode ser selecionada do grupo compreendendo sangue, soro, plasma ou outro fluido corporal, sem a necessidade de grandes quantidades desta. O suporte sólido pode compreender materiais consistindo de nitrocelulose, nylón, látex, polipropileno, poliestireno ou outro utilizado com a mesma finalidade dos demais descritos.

[046] Na etapa %~~a~~, o anticorpo secundário pode compreender IgG, IgM, IgA, IgE e respectivas subclasses. A proteína relacionada a esta etapa

pode ser Proteína A e/ou Proteína G. A enzima descrita nessa etapa pode ser selecionada do grupo consistindo de peroxidase, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, urease, xantina oxidase, glicose oxidase e penicilinase. Além do mais, o marcador pode ser selecionado do grupo consistindo de enzimas, radioisótopos, biotina, cromóforos, fluoróforos e quimioluminescentes.

[047] Na etapa %at, o anticorpo de detecção pode ser selecionado do grupo compreendendo detecção de fluorescência, imunofluorescência, imunoluminescência, absorbância ou de radioisótopos.

[048] O anticorpo monoclonal proposto na presente invenção pode também ser usado em processos para purificação da proteína gp43. Como exemplos, não limitantes, de processos para purificação da proteína gp43 utilizando o anticorpo monoclonal proposto na presente invenção, pode-se citar: imunocromatografia, Western blot, Dot blot, imundifusão e imunoprecipitação.

[049] Um método, não limitante da tecnologia, para purificação da proteína gp43, caracteriza-se por compreender as seguintes etapas:

- a. Ligação do anticorpo monoclonal proposto na presente invenção a uma resina de proteína G/sepharose, covalentemente ligada por molécula de dimetil pimelimidato (DMP);
- b. Equilíbrio da resina da coluna de imunocromatografia com tampão fosfato pH neutro;
- c. Exposição do antígeno ou solução contendo gp43 aos anticorpos ligados à resina gerada na etapa (a);
- d. Após a etapa (c), lavagem da resina com solução de tampão fosfato pH neutro para remoção de moléculas não ligadas;

- e. Eluição da molécula de gp43 purificada com glicina 0,1M pH 2,7, cujas frações devem ser imediatamente neutralizadas com solução de Tris-HCl 1M pH 9,0.

[050] Além disso, o anticorpo monoclonal proposto na presente invenção pode ser utilizado na identificação ou mapeamento de sequências antigênicas imunodominantes na proteína gp43 específica dos fungos *Paracoccidioides brasiliensis* e/ou *P. lutzii*.

[051] Um método, não limitante da tecnologia, para identificação ou mapeamento de sequências antigênicas imunodominantes na proteína gp43, caracteriza-se por compreender as seguintes etapas:

- a. Síntese química de pentadecapeptídeos em membrana de celulose, com passo de 3 resíduos a cada peptídeo, de forma a percorrer toda a sequência linear da molécula de gp43;
- b. Exposição do anticorpo monoclonal proposto na presente invenção aos peptídeos da membrana da etapa (a), após o bloqueio de sítios livres de proteínas;
- c. Adição de um anticorpo ou uma proteína, que estejam conjugados a uma enzima ou a um marcador e que se liguem aos anticorpos monoclonais da amostra da etapa (b);
- d. Detecção específica dos anticorpos na membrana na etapa (b), utilizando-se reagentes capazes de detectar a enzima ou o marcador citados na etapa (c);
- e. Identificação dos epitopos reconhecidos por anticorpos monoclonais.

[052] A presente invenção pode ser mais bem compreendida através dos exemplos que se seguem, não limitantes.

EXEMPLO 1 É PURIFICAÇÃO DE GP43

[053] O exoantígeno de *P. brasiliensis* cepa B-339 foi produzido conforme descrito por Camargo e colaboradores (1988). Os抗ígenos de *Leishmania*

braziliensis, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Trichophyton rubrum* foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose a 25°C. A fase leveduriforme de *H. Capsulatum* foi cultivada em ágar extrato de malte a 37°C. As colônias foram removidas mecanicamente e inativadas com timerosal (2 g/L). Após dois ciclos de congelamento/descongelamento, as células foram rompidas por sonicação em banho de gelo. As colônias de *Micobacterium tuberculosis* foram mecanicamente removidas e ressuspensas em tampão fosfato salino (PBS) pH7,4. As bactérias foram inativadas por autoclavação (1 hora a 121°C, 2 atm), e sonicadas em banho de gelo. Todas as amostras foram centrifugadas (10.000xg a 4°C por 10 minutos) e o coquetel inibidor de protease (ProteoBlockTM Protease Inhibitor Cocktail - Fermentas) foi adicionado ao sobrenadante. As amostras proteicas foram quantificadas pelo método de Bradford modificado e armazenadas a -20°C.

[054] Para purificação de gp43, cinco mililitros de solução supersaturada de sulfato de amônio foram gotejados lentamente ao mesmo volume de soro policlonal de coelho anti-gp43 sob lenta agitação, em banho de gelo. A mistura foi incubada overnight a 4°C sob agitação. Os anticorpos precipitados foram separados por centrifugação (3000xg por 10 minutos) e dialisados exaustivamente contra carbonato de sódio 0,1M pH 8,3. As imunoglobulinas foram quantificadas pelo método de Bradford modificado, e 10 mg foram acoplados em 1 mL de Sepharose® 4B (Sigma-Aldrich) seguindo as instruções do fabricante. O exoantígeno foi incubado por 2 horas à temperatura ambiente, e então a resina foi lavada com 10 volumes de PBS. O antígeno purificado foi dialisado contra água overnight a 4°C e quantificado por Bradford modificado.

EXEMPLO 2 É PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONais

[055] O antígeno total de *P. brasiliensis* e a proteína gp43 purificada foram utilizados como imunógenos em diferentes estágios da produção de mAbs.

Os procedimentos de imunização, ELISA de screening de soro reativos com gp43 e exoantígeno de *P. brasiliensis*, e fusão de células de esplenócito e mieloma foram baseados em um protocolo previamente descrito (Alvarenga, L. M., M. S. Martins, J. F. Moura, E. Kalapothakis, J. C. Oliveira, O. C. Mangili, C. Granier, and C. Chávez-Olórtegui, 2003, Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay: Toxicon, v. 42, p. 725-31; Tavares, C. A., R. de Rossi, G. Payares, A. J. Simpson, D. J. McLaren, and S. R. Smithers, 1984, A monoclonal antibody raised against adult *Schistosoma mansoni* which recognizes a surface antigen on schistosomula: Z Parasitenkd, v. 70, p. 189-97). Após coleta de sangue pré-imune, camundongos Balb/c foram imunizados com emulsão 1:1 (v/v) de exoantígeno (25 g) e adjuvante de Freund completo. Após três semanas, receberam dose reforço com emulsão contendo as mesmas quantidades de antígeno e adjuvante de Freund incompleto (AFI). Após duas e quatro semanas, os camundongos foram injetados com emulsão contendo 18 e 10 g de gp43 purificada, respectivamente. Após sete dias, foi realizada um sangria e o título de anticorpos foi analisado por ELISA contra o exoantígeno total e gp43 purificada. O camundongo que apresentou a maior reatividade por ELISA frente ao exoantígeno total e gp43 recebeu uma dose reforço de 3 g de gp43 purificada via intravenosa em PBS. Após três dias, células do baço foram coletadas e fusionadas a células de mieloma (Sp2/0). As células foram cultivadas usando Dulbecco's Modified Eagle's Medium . high glucose (Sigma-Aldrich), suplementado com soro fetal bovino 20% (v/v) (Gibco), penicilina/estreptomicina 100 U/mL/100 g/mL (Gibco), glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich), em estufa com atmosfera umidificada e dióxido de carbono a 5%. Durante as expansões, a concentração de soro fetal bovino foi progressivamente reduzida (10, 5 e 2,5%). Os hibridomas específicos

foram selecionados por ELISA e submetidos a uma clonagem por diluição limitante para individualização das células. As células produtoras de anticorpos monoclonais (mAbs) foram expandidas e os sobrenadantes foram testados por ELISA e western blot para avaliar a especificidade usando os抗ígenos preparados.

[056] Para o teste de ELISA indireto para determinação de anticorpo anti-gp43, placas de 96 poços MaxiSorp® fundo chato (Nunc) foram imobilizadas com 50 L com solução a 3,5 g/mL de gp43 purificada ou a 5,0 g/mL de exoantígeno em tampão carbonato de sódio 0,02 M, pH 9,6 (coating buffer) por 16 horas a 4°C. O ensaio foi conduzido conforme previamente descrito (Chavez-Olortegui et al., 1991), usando soros (diluição 1:200 a 1:3200) coletados dos camundongos submetidos ao protocolo de imunização para produção de mAbs. Após as lavagens, anticorpo anti-camundongo conjugado à peroxidase A4416 (Sigma-Aldrich) foi adicionado a 1:4000. Absorbância foi mensurada a 490 nm com leitor Bio-Rad Model 550. Todas as medidas foram tomadas em duplicata. Soro pré-imune foi adicionado como controle.

EXEMPLO 3 É ENSAIOS DE ANÁLISE DE ESPECIFICIDADE

[057] A reatividade cruzada dos mAb anti-gp43 foi avaliada frente antígenos de *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *T. rubrum*, *C. neoformans*, *M. tuberculosis* e *L. braziliensis* por ELISA e western blot. O ensaio de ELISA foi realizado conforme descrito anteriormente. No entanto, foi utilizada uma solução a 40 g/mL dos antígenos na etapa de imobilização da placa e foram utilizados sobrenadantes celulares como fonte de anticorpos primários. Os sobrenadante do mAb 2A7C5 foi avaliado primeiramente por ELISA (**Figura 1**).

[058] Dez g dos antígenos e 2 g da proteína gp43 purificada foram analisados por SDS-PAGE (12%) sob condições redutoras. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de

nitrocelulose, que foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS, tween 20 0,05%, leite desnatado 3%). Os sobrenadantes da cultura das células selecionadas por ELISA ou o soro de coelho anti-gp43 (1:5000) foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Após lavagens com PBS acrescido de Tween 20 0,05%, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anti-camundongo peroxidase A4416 (Sigma-Aldrich) 1:4000 em tampão de bloqueio. As membranas foram lavadas e reveladas primeiramente com substrato quimioluminescente (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate . Thermo Scientific) por 5 minutos, e então com 3,3qdiaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) e 4-cloro-naftol por 30 minutos, como descrito previamente (Alvarenga et al., 2003).

[059] O sobrenadante dessas células foi testado por western blot frente aos antígenos previamente mencionados em gel de eletroforese, e outro gel corado por prata foi utilizado para confirmação dos antígenos, onde percebeu-se grande variedade de componentes em todas as amostras, exceto para gp43 purificada, na qual existem proteínas que foram copurificadas com gp43 e, provavelmente, anticorpos de coelho que foram eluídos da coluna, pois a ligação entre as proteínas e a resina de sepharose 4B não é tão estável quando há alteração no pH (**Figura 2 F**). Novamente, o mAb 2A7C5 (**Figura 2 A-B**) e o mAb 4E9F6 (**Figura 2 C-D**) apresentaram especificidade na detecção de gp43, tanto na amostra purificada, quanto no exoantígeno total de *P. brasiliensis*, enquanto que foi evidenciado que o soro policlonal de coelho anti-gp43 reconhecia diversas proteínas presentes no exoantígeno total de *P. brasiliensis*, assim como nos antígenos correlacionados, como *H. capsulatum*, *Aspergillus* spp., *T. rubrum* e *M. tuberculosis* (**Figura 2 E**).

EXEMPLO 4 É PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONais (mAbs) E IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS POR SPOT-SYNTHEsis

[060] As imunoglobulinas do sobrenadante da cultura de mAbs foram purificadas usando coluna de proteína G (Protein G HP . GE Healthcare) acoplada a um sistema Äkta Pure (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada a 5 mL/min com fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0; e então o sobrenadante foi injetado na coluna a 2,5 mL/min. A coluna foi lavada com 7 volumes de coluna (VC) de tampão fosfato a 5 ml/min, e as IgGs foram eluídas com glicina 0,1 M pH2,7 no mesmo fluxo. Frações (1 mL) foram coletadas e o pH foi imediatamente neutralizado com a quantidade adequada de Tris-HCl 1 M pH 9,0. Em seguida o tampão foi substituído por fosfato 20 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4 usando coluna de dessalinização HiPrep 26/10 (GE Healthcare), com fluxo de 10 mL/min. Os mAbs purificados foram concentrados usando Vivaspin® Turbo 15 de 50 kDa (Sartorius) e quantificados por Bradford modificado.

[061] Cento e vinte e seis pentadecapeptídeos sobrepostos (15-mer) com mudança de 3 resíduos cobrindo a sequência da proteína gp43 madura de *P. brasiliensis* (GenBank AAC49253.2) (Cisalpino, P. S., R. Puccia, L. M. Yamauchi, M. I. Cano, J. F. da Silveira, and L. R. Travassos, 1996, Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of Paracoccidioides brasiliensis: J Biol Chem, v. 271, p. 4553-60.) foram sintetizados em membrana de celulose pela técnica de spot-synthesis (Frank, R., 1992, SPOT-SYNTHESIS - AN EASY TECHNIQUE FOR THE POSITIONALLY ADDRESSABLE, PARALLEL CHEMICAL SYNTHESIS ON A MEMBRANE SUPPORT: Tetrahedron, v. 48, p. 9217-9232.), seguindo protocolo previamente descrito (Laune, D., F. Molina, G. Ferrières, S. Villard, C. Bès, F. Rieunier, T. Chardès, and C. Granier, 2002, Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding: J Immunol Methods, v. 267, p. 53-70.). No entanto, um sintetizador automático ResPep SL (Intavis AG, Bioanalytical Instruments, Alemanha) foi utilizado. As membranas de

celulose foram obtidas da Intavis (Koln, Alemanha) e os fluorenilmetyl oxicarbonil (Fmoc) da Novabiochem. Os aminoácidos do resíduo C-terminal de cada peptídeo foram acoplados usando a química do Fmoc sobre um membrana de celulose contendo um grupamento amino-polietilenoglicol. Após a desproteção do Fmoc, outros aminoácidos foram sequencialmente acoplados assim como na síntese peptídica convencional. Finalmente, os grupos protetores das cadeias laterais foram removidos pelo tratamento com ácido triflúoracético na presença dos *scavengers* apropriados.

[062] Após bloqueio *overnight* com o tampão de saturação (PBS, Tween 20 0,1%, sacarose 5%, soro albumina bovina 3%), as membranas foram incubadas com solução contendo mAbs (10, 25, 40, 50 e 100 g/mL) ou soro de coelho anti-gp43 (1:1000) diluídos no tampão de saturação por 90 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Depois da incubação com IgG anti-camundongo A3688 ou anti-coelho A3687 conjugadas à fosfatase alcalina (diluídas 1:3000) (Sigma-Aldrich), e das lavagens apropriadas, a reação foi desenvolvida com o substrato 5-bromo-4-cloro,3-indolil fosfato (BCIP) (Sigma-Aldrich) e 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio brometo (MTT) (Sigma-Aldrich). Sobre os spots positivos, um precipitado azul se formou, e para permitir a re-utilização da membrana, ela foi tratada sequencialmente com dimetilformamida, seguida por dodecilsulfato de sódio 1%, 2-mercaptoetanol 0,1% em ureia 8 M pH8,0, seguido pela solução de etanol/água/ácido acético 50:40:10 (v/v/v) e, finalmente, metanol para remover o corante precipitado e as moléculas ligadas aos peptídeos.

[063] O modelo da estrutura terciária de gp43 foi criado utilizando a ferramenta iterativa *Iterative Threading ASSEmbly Refinement* (I-TASSER) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), que é um método hierárquico para predição de função e estrutura de proteínas (Roy, A., A. Kucukural, and Y. Zhang, 2010, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction: Nat Protoc, v. 5, p. 725-38.; Yang,

J., R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, and Y. Zhang, 2015, The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction: Nat Methods, v. 12, p. 7-8.; Zhang, Y., 2008, I-TASSER server for protein 3D structure prediction: BMC Bioinformatics, v. 9, p. 40.). O epítopo resultante do alinhamento das sequencias dos spots reativos foi identificado na estrutura tridimensional de gp43 para análise de acessibilidade na molécula.

[064] Em menores concentrações apenas uma região foi evidenciado (spots 81 a 83), no entanto, quando empregado maiores concentrações de mAb 2A7C5 outras regiões imunorreativas foram reveladas, como ilustrado na **Figura 3**. Para visualizar a localização do epítopos mapeados foi gerado um modelo tridimensional de gp43 com o software I-TASSER. A região destacada em vermelho corresponde à sequencia de aminoácidos dos spots 81 a 83, localizada em uma região exposta da molécula, enquanto que A partir do modelo excluiu-se a possibilidade dos peptídeos dos spots 6 a 9, pois o peptídeo em comum se encontra no núcleo hidrofóbico da proteína. Os peptídeos dos spots 35, 65 e 66 foram descartados, pois só reagiram em concentrações elevadas do anticorpo monoclonal, o que sugere reação inespecífica. Enquanto que o peptídeo dos spots 81 a 83 se encontra na superfície da molécula, sendo o provável sítio de ligação do anticorpo **Figura 4**.

EXEMPLO 5 É PURIFICAÇÃO DE GP43 USANDO mAb 4E9F6

[065] O anticorpo monoclonal 4E9F6 foi incubado com a resina de proteína G (Protein G Sepharose 4 Fast Flow . GE Healthcare) durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação de acordo com a capacidade de ligação da resina descrita pelo fabricante. Em seguida foram realizadas lavagens sequenciais com PBS pH 7,4 e pH 8,0 (duas lavagens) seguidas por centrifugação a 28.500xg por 6 minutos. Adicionou-se dimetilpimelimidato (DMP) 13 mg/mL, dissolvido em trietanolamina 0,2 M pH 8,2, na proporção 1:1 com o volume de resina (VR) que foi incubado durante 30 minutos sob

agitação. Após lavagem com trietanolamina 0,2 M e centrifugação, a incubação com DMP e lavagens foram repetidas duas vezes. Em seguida foi adicionado etanolamina 0,1 M pH 8,2 na proporção 1:1 com o VR por 5 minutos, em seguida foi realizada centrifugação. Duas etapas de lavagem e centrifugação foram realizadas, uma com etanolamina e uma com PBS pH 7,4. Glicina 0,1 M pH 2,7 foi incubada 2 vezes durante 5 minutos seguido por centrifugação. Para finalizar, o pH foi reestabelecido com PBS pH 7,4 e a coluna armazenada em PBS com azida 0,05%. Todas as etapas de incubação foram realizadas em temperatura ambiente, enquanto as centrifugações foram feitas a 4°C.

[066] Para purificar gp43, ao exoantígeno de *P. brasiliensis* produzido no CPPI foi acrescido de inibidor de protease (Protease Inhibitor Mix . GE Healthcare) e este foi incubado com a resina de mAb 4E9F6 ligado à proteína G/sepharose durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com 10 VC de PBS pH 7,4, gp43 foi eluída com glicina 0,1 M pH 2,7, cujas frações foram imediatamente neutralizadas com a quantidade apropriada de Tris-HCl 1 M pH 9,0. O pH da coluna foi reestabelecido com PBS pH 7,4. A **Figura 5** apresenta o resultado da purificação em gel de eletroforese corado pelo método de coloração com prata.

EXEMPLO 6 É ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-GP43 NO SORO DE PACIENTES

[067] Placas Costar® flat-bottom 96 well plate (Corning Incorporated) foram sensibilizadas overnight à 4°C com 50 L de uma solução a 3,5 g/mL de gp43 purificada por imunocromatografia com anticorpo monoclonal 4E9F6 em *coating buffer*. O ensaio foi conduzido como descrito anteriormente, mas os poços foram bloqueados com Pierce® Protein-Free T20 Blocking Buffer (Thermo Scientific) por uma hora a 37°C. Após esse período, foram incubados os soros dos pacientes foram diluídos 1:400 na mesma temperatura por uma hora. Após lavagem, anticorpo anti-fração Fc humana

específico peroxidase (Sigma-Aldrich A0170) foi adicionado na diluição 1:10.000 nas mesmas condições. A absorbância foi medida a 490 nm usando o leitor iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Os resultados estão apresentados na **Figura 6 A.**

[068] De forma semelhante ao modelo acima, outro formato de ELISA foi testado, usando 50 L de uma solução a 250 ng/mL de anticorpo monoclonal 4E9F6 purificado para sensibilizar cada poço da placa *overnight* a 4°C. Os poços foram bloqueados com Pierce® Protein-Free T20 Blocking Buffer (Thermo Scientific) a 37°C por uma hora e, em seguida, foi adicionada uma solução a 300 ng/mL de gp43 purificada por imunocromatografia com anticorpo monoclonal 4E9F6 por uma hora na mesma temperatura. Após lavagem, os soros dos pacientes diluídos 1:4000 foram incubados nas mesmas condições dos ensaio anterior. Em seguida, foi adicionado o anticorpo anti-fração Fc humana específico peroxidase (Sigma-Aldrich A0170) diluído 1:10.000 durante uma hora a 37°C. A absorbância foi medida a 490 nm usando o leitor iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Os resultados estão apresentados na **Figura 6 B.**

EXEMPLO 7 É CONSTRUÇÃO DO FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA SIMPLES (scFv)

[069] Para obtenção fragmento variável de cadeia simples (scFv) foi utilizada a mesma metodologia descrita por (Fields, C., D. O'Connell, S. Xiao, G. U. Lee, P. Billiald, and J. Muzard, 2013, Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies: Nat Protoc, v. 8, p. 1125-48). Resumidamente, para se construir moléculas de scFv a partir do mAb 2A7C5 anti-gp43, os hibridomas foram cultivados normalmente e quando as células atingiram máxima confluência foram submetidas a extração de RNA pelo método de Trizol. O material genético obtido foi tratado com DNase e em seguida cDNA foi gerado

utilizando transcriptase reversa (AMV Reverse Transcriptase . New England BioLabs). A partir do cDNA total obtido as cadeias VH e VL dos mAbs foram amplificadas utilizando Platinum® Taq DNA polimerase (ThermoFisher Scientific) e a combinação de primers específicos: VH_{for} (5q GACAGTGGATARACMGATGG-3) e VH_{rev} (5q GAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3q), ou a combinação de VL_{for} (5q GGATACAGTTGGTGCAGCATT-3q com VL_{rev1} (5q GAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3q, VL_{rev2} (5q GATATTGTGATGACGCAGGCT-3q, VL_{rev4} (5q GACATTGTGCTGACCCAATCT-3q, VL_{rev5} (5q GACATTGTGATGACCCAGTCT-3q, VL_{rev6} (5q GATATTGTGCTAACTCAGTCT-3q, VL_{rev7} (5q GATATCCAGATGACACAGACT-3q, VL_{rev8} (5q GACATCCAGCTGACTCAGTCT-3q e VL_{rev9} (5q CAAATTGTTCTCACCCAGTCT-3q assim como previamente descrito Fields et al. (2013), usando desnaturação a 94_C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos (94_C por 2 minutos, 55_C por 30 segundos, 68_C por 3 minutos) e 3 minutos a 68_C. Devido à possibilidade de amplificação do gene da cadeia aberrante de VL oriunda das células sp2/0, os produtos de PCR foram submetidos à clivagem com BciVI (Bful). Somente a combinação que não apresentou produto de clivagem foi escolhida para ligação ao vetor pGEM T ou pGEM T Easy (Promega). Células de Escherichia coli TG1 termocompetentes foram transformadas com 50 ng do vetor ligado e plaqueadas em ágar LB, acrescido de ampicilina 50 g/mL, isopropil -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 0,8 mM e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- -D-galactopiranosídeo (X-Gal) 0,1 mM, todos na concentração final. PCR de colônia foi empregada para confirmação de colônias positivas, utilizando os mesmos primers usados para amplificar VH e VL, as quais foram posteriormente cultivadas, e os plasmídeos extraídos por mini-prep usando

fenol/clorofórmio, tratamento com RNase e purificação usando MSB® Spin PCRapce/Invisorb® Fragment Clean Up (Invitek). Após quantificação, os plasmídeos foram sequenciados utilizando BigDye® terminator e os primers M13for (5qd(GTTTCCCAGTCACGAC)-3), M13rev (5q d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3) e T7 promoter (5'-d (TAATACGACTCACTATAGGG)-3'). Os sequenciamentos foram alinhados e a sequencia consenso foi analisada utilizando a ferramenta iterativa < http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest> foram identificadas as regiões determinantes de complementaridade (CDR) e a estrutura do %olar de pérolas+para cada cadeia.

[070] As sequências amplificadas foram purificadas, ligadas em vetores pGEM T ou pGEM T Easy e transformadas em *E. coli*, que foram cultivadas e tiveram seus plasmídeos extraídos. Os plasmídeos purificados foram sequenciados com os primers indicados e, as sequencias obtidas analisadas em um banco de dados de estruturas e sequencias de anticorpos. As sequências apresentaram homologia com as cadeias leves e pesadas de anticorpos (IgGs) murinos e foi apresentada a estrutura do %olar de pérolas+ com formação dos CDRs, como mostrado na **Figura 7** para o mAb 2A7C5.

[071] A sequência do scFv foi construída pela união das cadeias pesada (VH) e leve (VL), descritas abaixo, obtidas no sequenciamento descrito anteriormente através de um fragmento de união sintético de (GGGGS)₃. As moléculas geradas possuem a seguinte sequencia de aminoácidos:

VH:

EVKLQESGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIHWVKQRPGQGLEWIGW
IYPGIANTKYNEKFQGKATLTVDTSSSTAHMQLSSLTSEDSAVYFCARSGL
YMYGFFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYPLS

VL

QIVLTQSPAFMSASPGEKVTMTCANSNLNYWYQQKPGSSPKPWIYR
TSNLASGVPARFSGSGSGTSLTISSVGAEDAATYYCQQYSTYPYTFGG
GTKLEIKRADAAPTVS

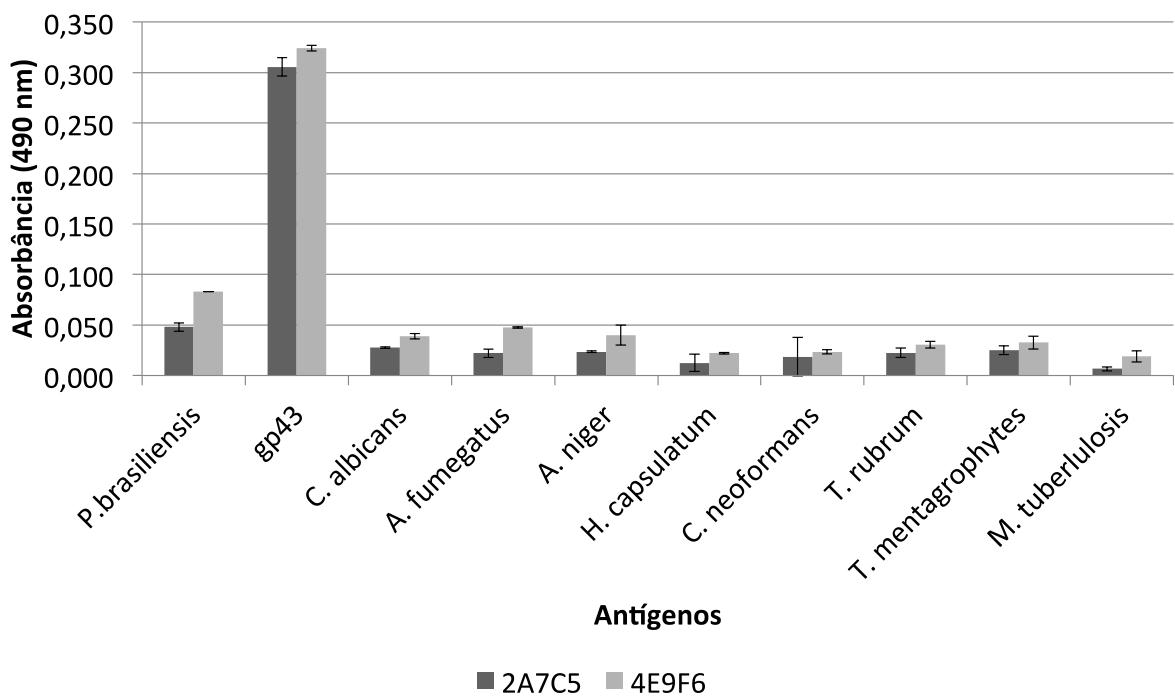
scFv:

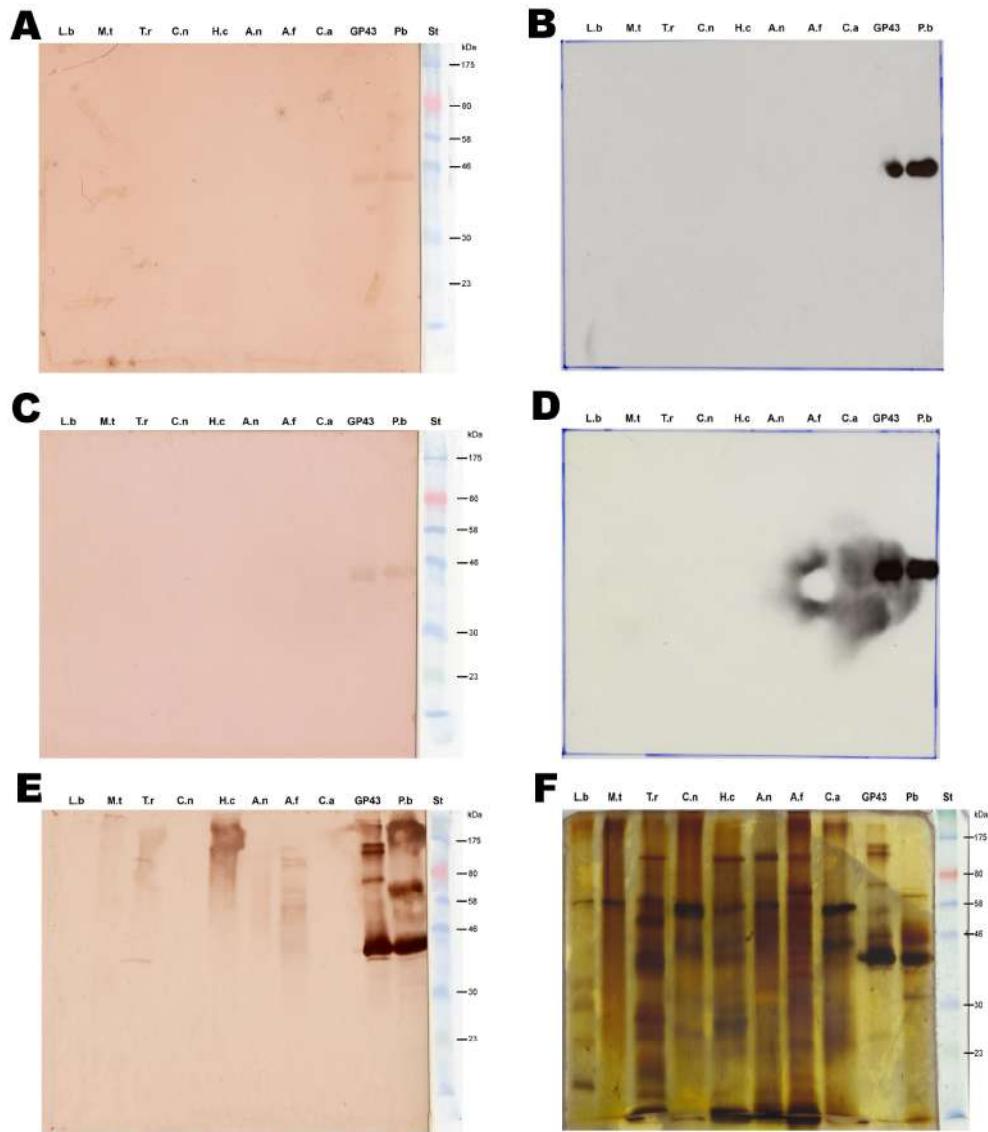
EVKLQESGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIHWVKQRPGQGLEWIGW
IYPGIANTKYNEKFQGKATLTVDTSSSTAHMQLSSLTSEDSAVYFCARSGL
YMYGFFDVWGAGTTVSSAKTPPSVYPLSGGGSGGGSGGGSQIVLTQ
SPAFLMSASPGEKVTMTCANSNLNYWYQQKPGSSPKPWIYRTSNLAS
GVPARFSGSGSGTSLTISSVGAEDAATYYCQQYSTYPYTFGGGTLEI
KRADAAPTVS

[072] A **Figura 8** apresenta o esquema detalhado das sequências aminoacídicas e também das sequências nucleotídicas otimizadas para *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* das moléculas de scFv. Já a **Figura 9** apresenta mais detalhadamente as construções possíveis dos insertos para expressão do scFv fusionado à

REIVINDICAÇÕES

- 1. ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-GP43, caracterizado por compreender a sequência aminoacídica definida pela SEQ ID N° 1.**
- 2. ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-GP43, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por estar associado à enzima fosfatase alcalina.**
- 3. USO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-GP43 definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser em métodos para diagnósticos da paracoccidioidomicose (PCM) baseados na identificação da proteína específica dos *Paracoccidioides brasiliensis* e/ou *P. lutzii*.**
- 4. USO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-GP43 definido na reivindicação 1, caracterizado por ser em processos para purificação da proteína gp43.**
- 5. USO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-GP43 definido na reivindicação 1, caracterizado por ser para identificar ou mapear sequências antigênicas imunodominantes na proteína específica dos fungos *Paracoccidioides brasiliensis* e/ou *P. lutzii*.**

DESENHOS**FIGURA 1**

**FIGURA 2**

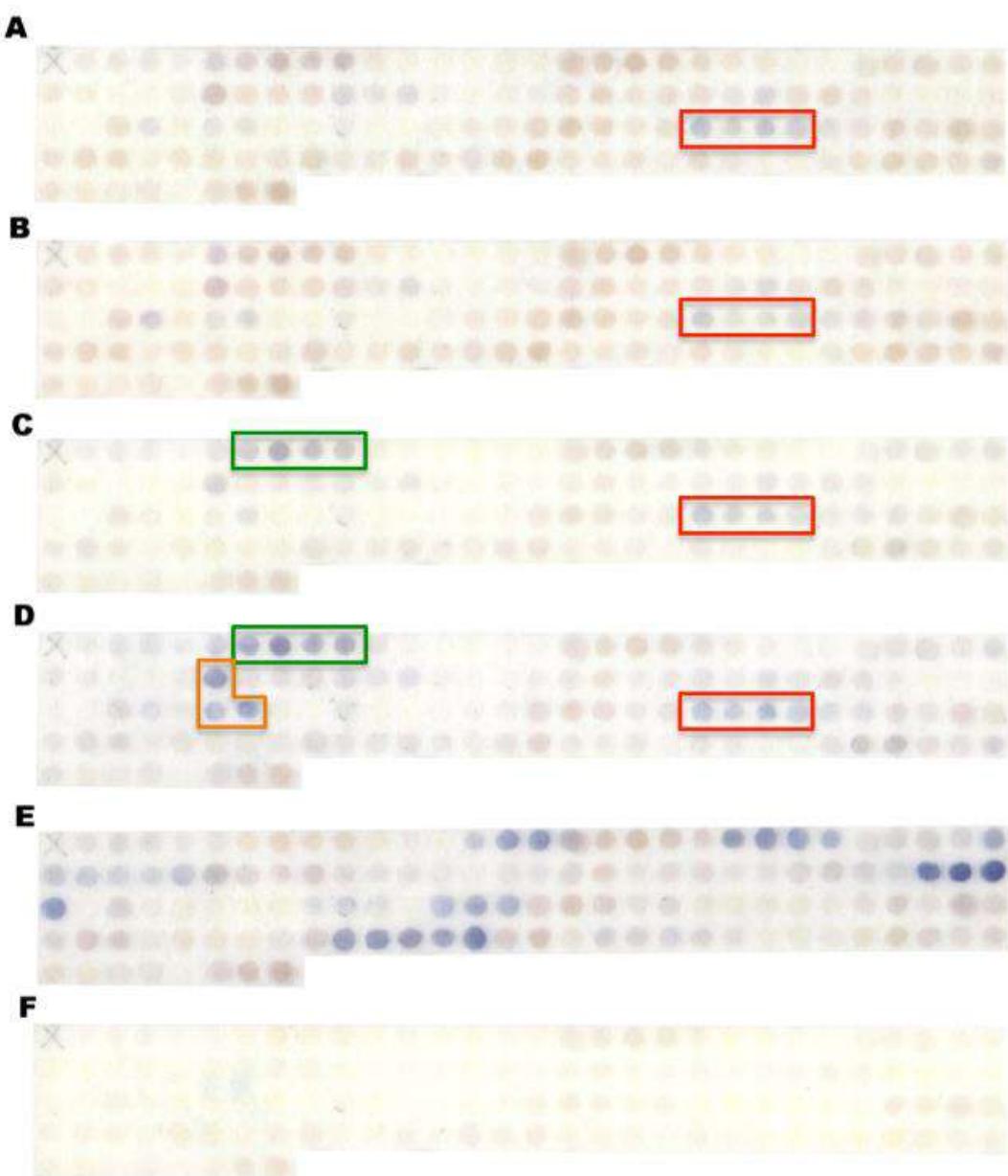
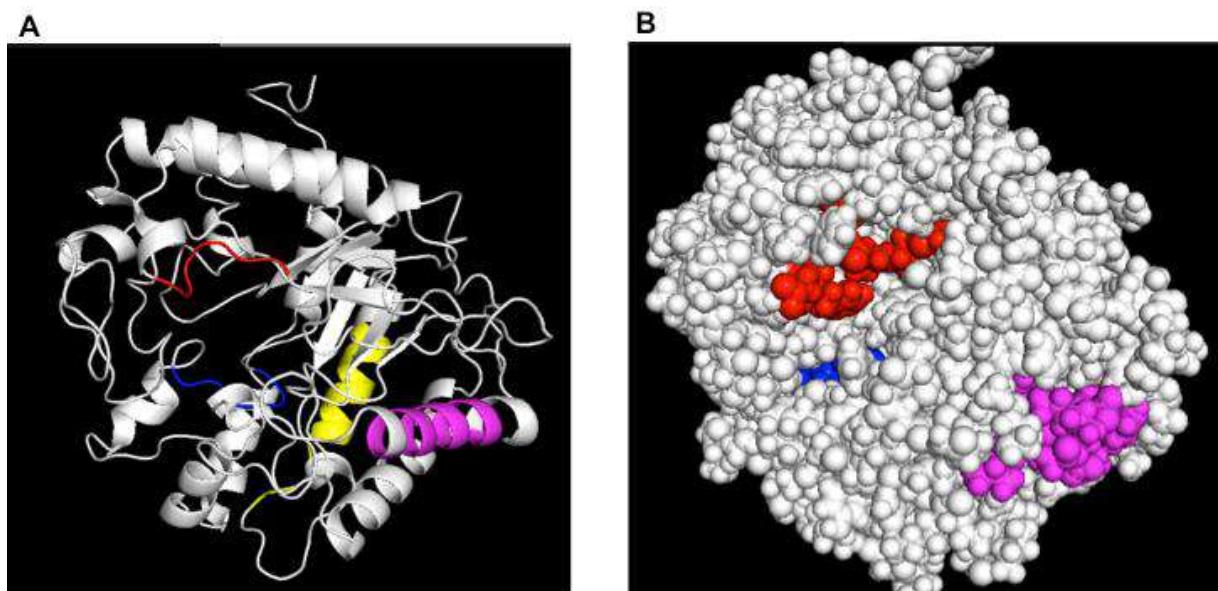
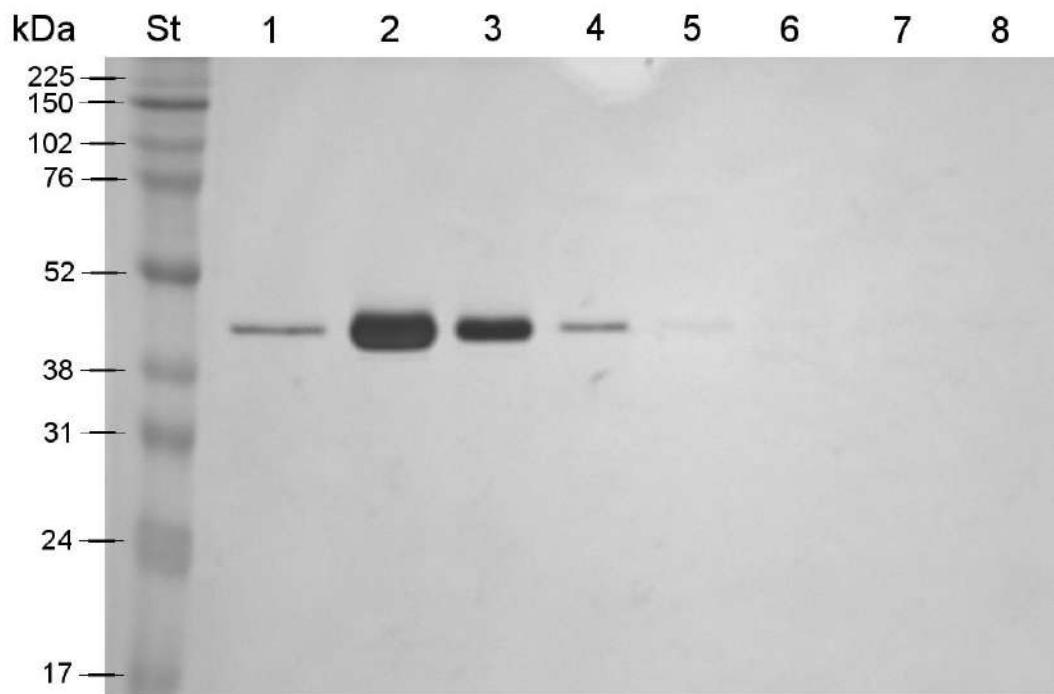
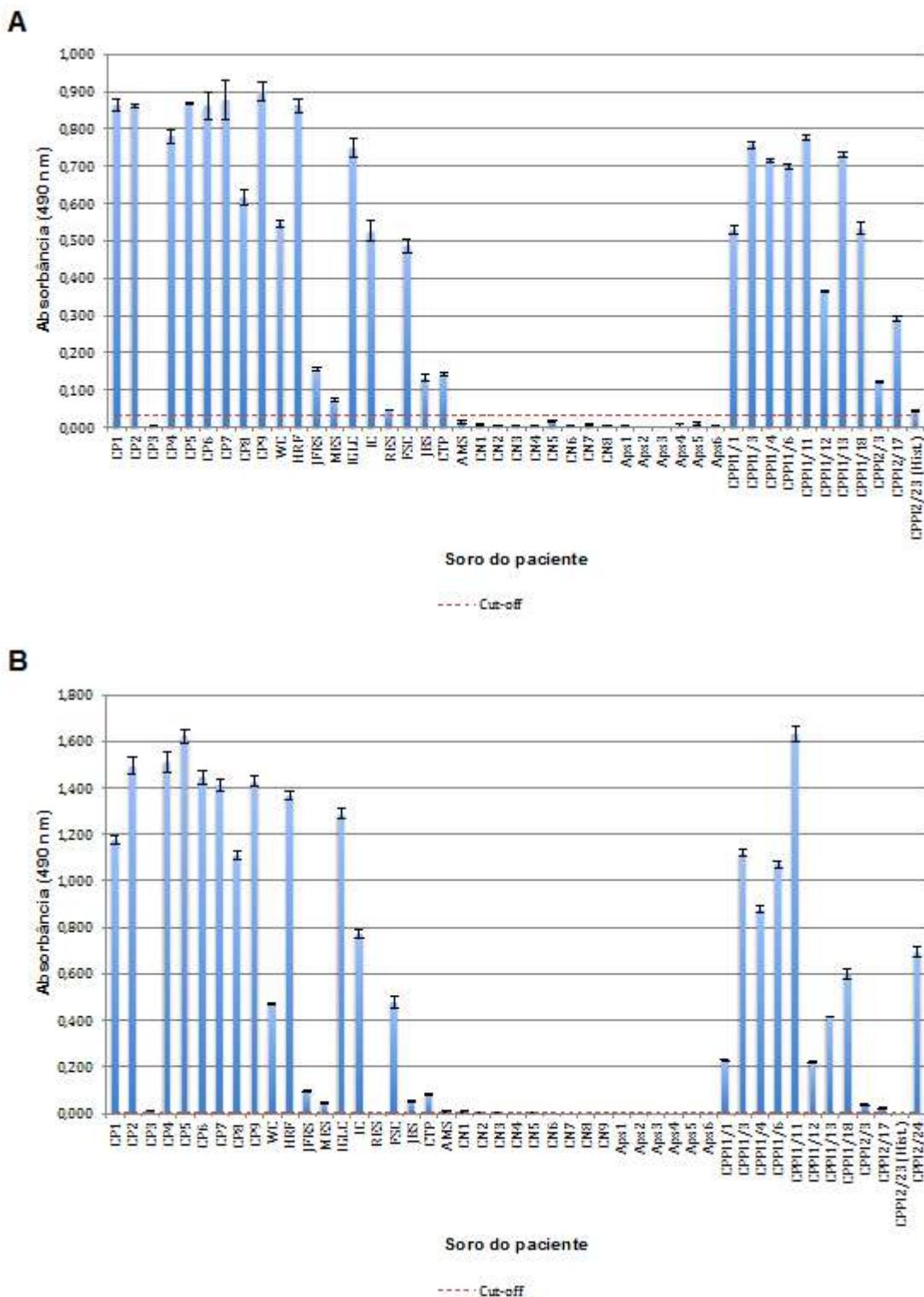


FIGURA 3

**FIGURA 4****FIGURA 5**

**FIGURA 6**

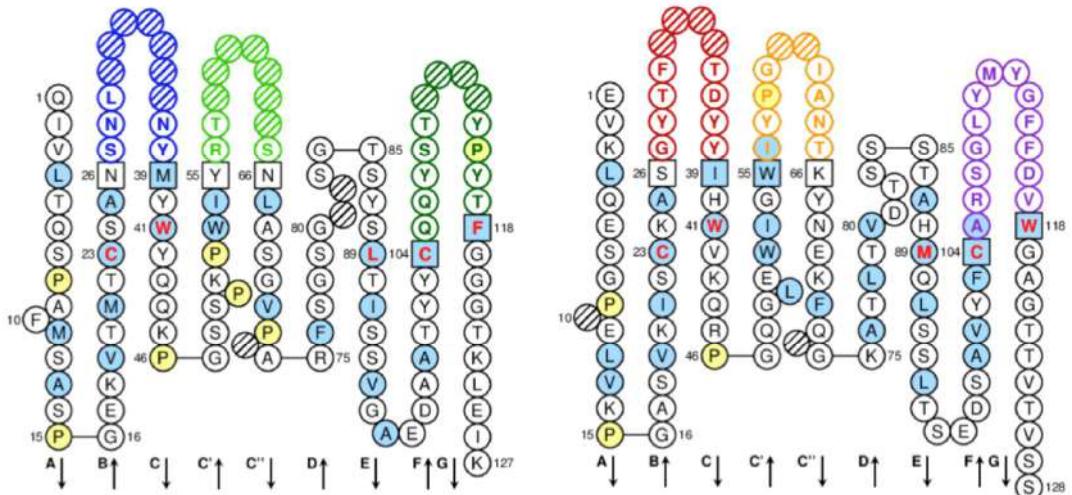


FIGURA 7

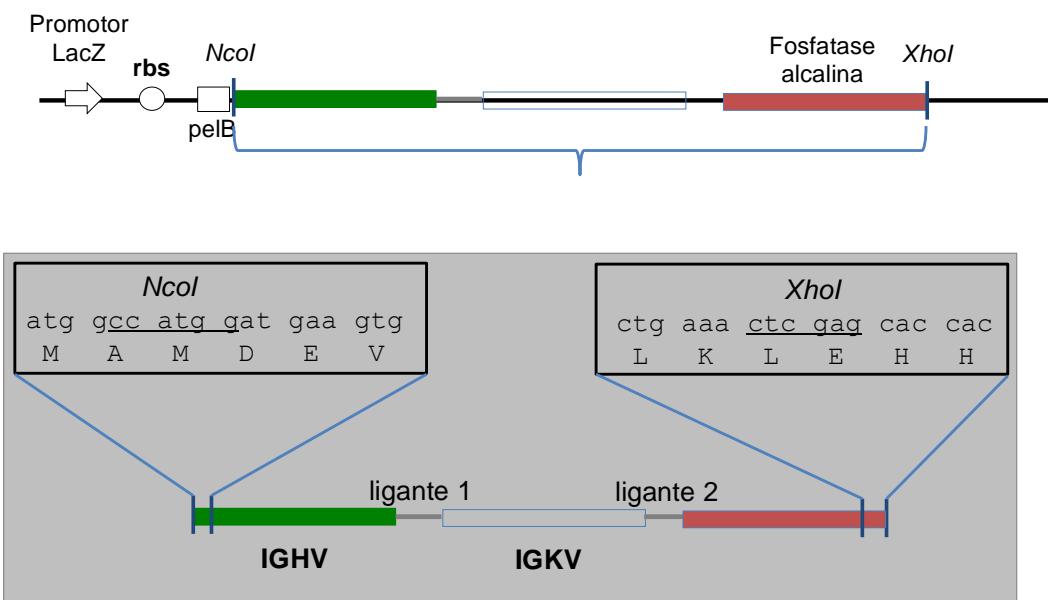
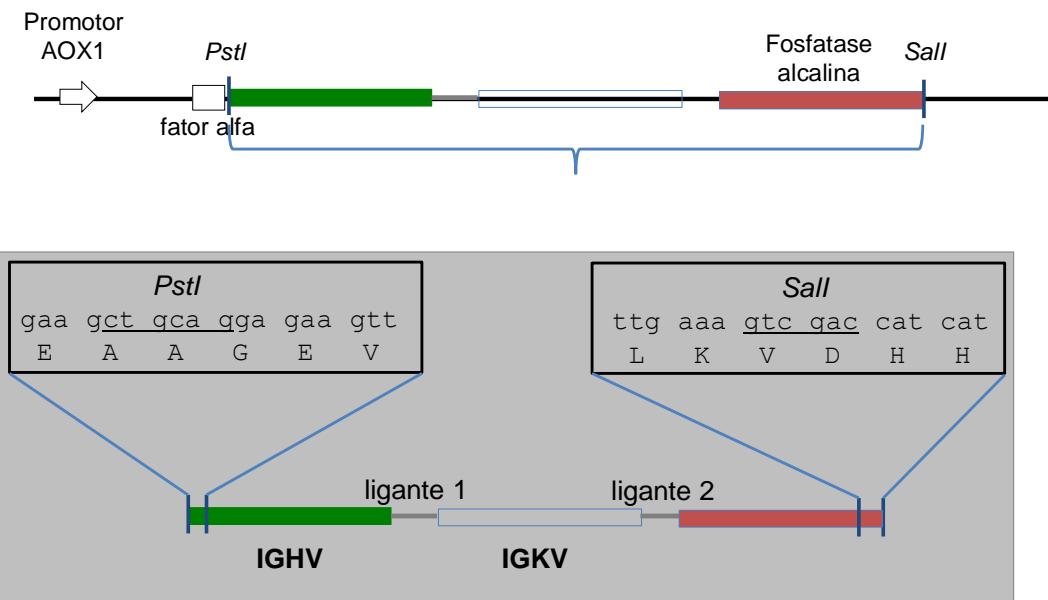
A

E	V	K	L	Q	E	S	G	P	E	L	V	K	P	G
gaa	gtg	aaa	ctg	cag	gaa	agc	ggt	ccg	gaa	ctg	gtg	aaa	ccg	gat
CDR1-VH														
A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T
gcg	agc	gtg	aaa	att	agc	tgc	aaa	gcc	agc	ggt	tat	acc	ttt	acc
D	Y	Y	I	H	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L
gat	tat	tat	att	cat	tgg	gtg	aaa	cag	cgt	ccg	ggt	cag	ggt	ctg
CDR2-VH														
E	W	I	G	W	I	Y	P	G	I	A	N	T	K	Y
gaa	tgg	att	gtt	tgg	att	tat	ccg	ggt	att	gcc	aat	acc	aaa	tat
N	E	K	F	Q	G	K	A	T	L	T	V	D	T	S
aat	gaa	aaa	ttt	cag	ggc	aaa	gcc	acc	ctg	acc	gtg	gat	acc	acc
S	S	T	A	H	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D
agc	agc	acc	gcc	cat	atg	cag	ctg	agc	agg	ctg	acc	agg	gaa	gtat
CDR3-VH														
S	A	V	Y	F	C	A	R	S	G	L	Y	M	Y	G
agc	gcc	gtg	tat	ttt	tgc	gcc	cgt	agg	gtt	ctg	tat	atg	tat	ggc
F	F	D	V	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S	S
ttt	ttt	gat	gtg	tgg	ggt	gcc	ggt	acc	acc	gtg	acc	gtg	agc	agc
A	K	T	T	P	P	S	V	Y	P	L	S	G	G	G
gcc	aaa	acc	acc	ccg	ccg	agc	gtg	tat	ccg	ctg	agc	ggt	ggg	gtt
peptídeo juncional linker														
G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	Q	I	V		
gtt	agc	ggt	ggg	gtt	agc	ggt	ggg	gtt	ggg	gtt	agc	ggc	att	gtg
L	T	Q	S	P	A	F	M	S	A	S	P	G	E	K
ctg	acc	cag	agc	ccg	gcc	ttt	atg	agc	gcc	agc	ccg	ggg	gaa	aaa
CDR1-ML														
V	T	M	T	C	S	A	N	S	N	L	N	Y	M	Y
tgg	tat	cag	cag	aaa	ccg	ggg	atc	ggc	agg	acc	atc	tat	atg	tat
CDR2-ML														
R	T	S	N	L	A	S	G	V	P	A	R	F	S	G
cgt	acc	agg	aac	ctg	gcc	agc	ggt	gtg	ccg	ggc	cgt	ttt	agc	ggt
S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	V	G
agc	ggt	agc	ggg	acc	agc	tat	agc	ctg	acc	att	agc	ggc	ttt	ggg
CDR3-ML														
A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	S	T	Y
gct	gaa	gat	gct	ggc	acc	tat	tat	tgc	cag	cag	tat	agc	acc	tat
P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R	A
ccg	tat	acc	ttt	ggt	ggt	ggt	acc	aaa	ctg	gaa	att	aaa	cgt	gcc
D	A	A	P	T	V	S								
gat	gcc	gcc	ccg	acc	gtg	agc								

B

E	V	K	L	Q	E	S	G	P	E	L	V	K	P	G
gaa	gtt	aag	ttg	caa	gag	tct	gga	cct	gaa	ttg	gtt	aag	cca	ggg
CDR1-VH														
A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T
gct	tct	gtt	aag	att	tct	tgt	aaag	gtc	tct	gga	tac	act	ttc	act
D	Y	Y	I	H	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L
gat	tac	tac	att	cac	tgg	gtt	aaag	caa	aga	cct	gga	caa	ggg	ttg
CDR2-VH														
E	W	I	G	W	I	Y	P	G	I	A	N	T	K	Y
gag	tgg	att	gtt	tgg	att	tat	cct	gga	att	gtc	aat	act	aaa	tac
N	E	K	F	Q	G	K	A	T	L	T	V	D	T	S
aat	gag	aag	ttt	caa	gga	aag	gct	act	ttg	act	gtt	gac	act	tct
S	S	T	A	H	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D
tct	tct	act	gtc	cac	atg	caa	ttg	tct	tct	ttg	act	tct	gaa	gac
CDR3-VH														
S	A	V	Y	F	C	A	R	S	G	L	Y	M	Y	G
tct	gtt	gtt	tct	tgc	tgt	tgt	gtt	tct	tgc	tgc	tat	atg	tac	gga
F	F	D	V	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S	S
ttc	ttt	gat	gtt	tgg	ggg	act	act	gtt	act	gtt	act	tct	tct	tct
A	K	T	T	P	P	S	V	Y	P	L	S	G	G	G
gct	aaa	act	act	cct	cca	tct	gtt	tat	cca	ttg	tct	gtt	ggg	gtt
peptídeo juncional linker														
G	S	G	G	G	G	G	G	G	G	S	Q	I	V	
gtt	tct	gtt	ggg	gtt	tct	gtt	ggg	tct	gtt	ggg	tct	gtt	ggg	
L	T	Q	S	P	A	F	M	S	A	S	P	G	E	K
tgt	act	caa	tct	cca	gtc	tcc	tct	tct	gtt	act	tct	cca	ttt	ggg
CDR1-ML														
V	T	M	T	C	S	A	N	S	N	L	N	Y	M	Y
gtt	act	atg	tat	tgt	tct	gtt	acc	tct	aat	ttg	aat	tac	atg	tac
W	Y	Q	Q	K	P	G	S	S	P	K	P	W	I	Y
tgg	tac	caa	caa	agg	cca	tca	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt
CDR2-ML														
R	T	S	N	L	A	S	G	V	P	A	R	F	S	G
aga	act	tct	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt
S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	V	G
tct	gga	tct	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt	ttt
CDR3-ML														
A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	S	T	Y
gct	gaa	gat	gct	ggc	acc	tat	tat	tgc	cag	cag	tat	agc	acc	tat
P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R	A
ccg	tat	acc	ttt	ggt	ggt	ggt	acc	aaa	ctg	gaa	att	aaa	cgt	gcc
D	A	A	P	T	V	S								
gat	gcc	gcc	ccg	acc	gtg	agc								

FIGURA 8

A**B****FIGURA 9**