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

(21) BR 102018076342-3 A2

(22) Data do Depósito: 18/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 18/05/2021

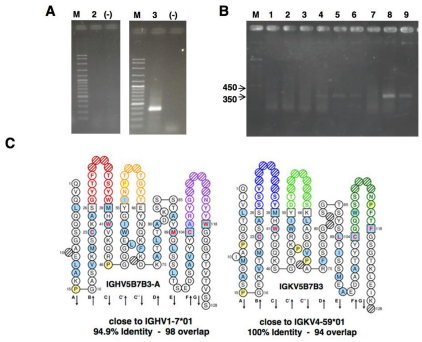
(54) Título: FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA SIMPLES (SCFV) DE ANTICORPO MURINO EM SUA FORMA RECOMBINANTE DETECTA HORMÔNIO DHEA EM AMOSTRAS HUMANAS

(51) Int. Cl.: A61K 31/5685; C12N 5/16; C12N 15/13.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) Inventor(es): RAFAELA LENZI FOGAÇA; ALESSANDRA BECKER FINCO; SABRINA KARIM SILVA; LARISSA MAGALHAES ALVARENGA; BONALD CALVACANTE DE FIGUEIREDO; PHILIPPE BILLIALD; JULIANA FERREIRA DE MOURA.

(57) Resumo: Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo murino em sua forma recombinante detecta hormônio DHEA em amostras humanas". O hormônio dehidroepiandrosterona é um marcador de carcinoma adrenocortical (CAC), pois o seu aumento na circulação pode ser proporcional à massa tumoral, por isso o interesse em desenvolver uma molécula capaz de detectar o hormônio. Para tanto, o hormônio DHEA foi conjugado com KLH e usado como imunógeno para obter hibridomas, de origem murina, anti-DHEA. Dos hibridomas secretores de imunoglobulina M (IgM) específica para o DHEA, foram obtidos RNAs mensageiros (RNAm) codificantes da cadeia leve e pesada do anticorpo IgM denominado 5B7. Esse RNAm foi usado como molde para a síntese de fita de DNA complementar (cDNA) o qual foi sequenciado e clonado em vetor de expressão de proteínas. Como produto obteve-se uma proteína recombinante que consiste no scFv que reconhece a molécula de DHEA de maneira muito semelhante à molécula parental. O scFv recombinante provou-se ser eficiente na detecção de DHEA no tecido adrenal normal e nas células de CAC permitindo a localização tecidual do DHEA.



"Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo murino recombinante detecta hormônio DHEA em tecidos humanos"

CAMPO DA INVENÇÃO

[001]. A presente invenção está relacionada ao campo da biologia molecular aplicada à medicina e à saúde humana. Esse documento destaca a sequência aminoacídica das regiões de complementariedade das cadeias leve e pesada, além de um peptídeo juncional, de uma molécula recombinante de anticorpo monoclonal murino de classe IgM capaz de detectar o hormônio dehidroepiandrostenediona (DHEA) em amostras humanas. O fragmento variável de anticorpo de cadeia simples (scFv), assunto desse documento, após ser expresso em sua forma recombinante, poderá ser utilizado para a detecção do DHEA em casos de puberdade prematura e de tumores da glândula supra-renal em crianças, bem como em casos de hirsutismo em adultos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

[002]. A dehidroepiandrosterona (3β-hidroxi-5-androsten-17-ona, DHEA) é um hormônio esteróide secretado principalmente pelo córtex adrenal, embora gônadas, cérebro, tecido adiposo e trato gastrointestinal também possam produzi-lo. Facilmente convertido em seu metabolito sulfatado, o sulfato de desidroepiandosterona (DHEA-S), DHEA e DHEA-S são os hormônios esteróides circulantes mais abundantes na circulação sanguínea humana (1).

[003]. No curso do desenvolvimento fetal humano, a zona fetal representa cerca de 85% do córtex adrenal e é responsável pela alta produção de DHEA (2,3). Normalmente, dentro de seis meses após o parto, a concentração de DHEA e DHEA-S tende a diminuir drasticamente e começa a aumentar novamente com a idade de 6 a 8 anos de idade quando o período de adrenarca se inicia e a camada

reticular da zona do córtex adrenal se torna a principal fonte de DHEA (4).

[004]. O DHEA-S e o DHEA são marcadores muito sensíveis e confiáveis de tumores adrenocorticais pediátricos funcionais porque aumentam progressivamente quando a massa tumoral ainda é indetectável por métodos de imagem (5). O carcinoma adrenocortical (CAC) é uma neoplasia maligna extremamente rara em crianças ao redor do mundo, mas que ocorre pelo menos 20 vezes mais no Sul do Brasil devido à alta frequência (0,27%) de uma mutação germinativa (R337H) do gene *TP53* na população (6,7).

[005]. O surgimento de metástases pulmonares, hepáticas ou CAC difundida é um desafio contínuo, dada a incerteza ou ausência de avaliação histopatológica adequada, e as limitadas ferramentas disponíveis para o diagnóstico e tratamento.

[006]. Tendo em vista a importância do DHEA e DHEA-S como marcadores para esse tipo de tumor, um anticorpo monoclonal murino anti-DHEA da classe IgM foi desenvolvido e caracterizado como sendo capaz de reconhecer o DHEA em células da zona reticular (RL) da supra-renal, um dos órgãos onde o hormônio é produzido.

[007]. Posteriormente, RNA mensageiro do correspondente hibridoma foi recuperado, transformado em cDNA com iniciadores da região hipervariável das cadeias leve (VL) e pesada (VH) de anticorpo. Essas sequências foram clonadas e sequenciadas de forma a se obter o fragmento de anticorpo de cadeia simples ou scFv (single chain variable fragmento) na forma recombinante.

[008]. Esse documento, portanto, tem como objetivo proteger a sequência aminoacídica das regiões de complementariedade (CDR) das cadeias leve e pesada desse scFv anti DHEA, bem como de seu uso como agente detector de DHEA em tecidos humanos.

[009]. No que se refere à produção de anticorpos monoclonais que reconhecem hormônios esteroides, há muitos produtos comerciais disponíveis atualmente. Ainda, há vários estudos, como os citados abaixo, que descrevem essas moléculas, incluindo seu uso, mas que diferem, quanto à produção, aplicação e alvo, do objeto desse documento. Além disso, nesses artigos não há informação sobre a sequência aminoacídica dos domínios e VH e VL dos anticorpos como destacado no presente documento.

[010]. Kohen F, Lichter S, Eshhar Z, Lindner HR. Preparation of monoclonal antibodies able to discriminate between testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone. **Steroids**. 39, p. 453-459,1982.

[011]. Fantl VE, Wang DY. Characterisation of monoclonal antibodies raised against testosterone. **J Steroid Biochem**. 19, p. 1605-1610, 1983.

[012]. Crichton D, Grattage L, McDonald A, Corrie JE, Steel CM, Hubbard AL, Al-Dujaili EA, Edwards CR. The production and assessment of monoclonal antibodies to cortisol. **Steroids**. 45, p. 503-517, 1985. doi 10.1016/0039-128X(85)90016-9.

[013]. White A, Gray C, Corrie JE. Monoclonal antibodies to testosterone: the effect of immunogen structure on specificity. **J Steroid Biochem**. 22 p. 169-175, 1985.

[014]. Gani M, Coley J, Piron J, Humphreys AS, Arevalo J, Wilson IA, Taussig MJ. Monoclonal antibodies against progesterone: effect of steroid-carrier coupling position on antibody specificity. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v. 48(2-3) p. 277- 282, 1994 https://doi.org/10.1016/0960-0760 (94)90156-2.

[015]. Pope A, Pritchard K, Williams A, Roberts A, Hackett JR, Mandecki W, Johnson KS. In vitro selection of a high affinity antibody to

oestradiol using a phage display human antibody library. **Immunotechnology**. 2, p. 209-17, 1996.

[016]. Dörsam H, Rohrbach P, Kürschner T, Kipriyanov S, Renner S, Braunagel M, Welschof M, Little M. Antibodies to steroids from a small human naive IgM library. **FEBS Lett**. 414, p. 7-13, 1997. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00966-6

[017]. Tamate K, Charleton M, Gosling JP, Egan D, Ishikawa M, Fottrell PF, Kane MM. Direct colorimetric monoclonal antibody enzyme immunoassay for estradiol-17β in saliva. **Clin Chem**. v. 43, p. 1159-64, 1997. http://clinchem.aaccjnls.org/content/43/7/1159.

[018]. No que se refere a anticorpos monoclonais que reconhecem o hormônio DHEA, há várias marcas comerciais desse produto que é usado tanto para pesquisa com para o diagnóstico laboratorial cujos endereços eletrônicos estão listados a seguir. Além disso, há artigos publicados relativos à produção desses anticorpos. Porém, esses estudos não revelam ou não possuem dados sobre a sequência aminoacídica das regiões de cadeia leve (VL) e cadeia pesada (VH) dessas moléculas como do objeto desse documento.

[019]. Endereços eletrônicos dos fornecedores de anticorpos monoclonais anti DHEA:

[020]. https://www.mybiosource.com/prods/Antibody/Monoclonal/Dehydroepiandrosterone/DHEA/datasheet.php?products_id=1494886

[021]. https://www.biocompare.com/9776-Antibodies/675868-anti-Dehydroepiandrosterone/?pda=9776|675868_0_0||4|anti%20DHEA

[022]. https://www.biocompare.com/9776-Antibodies/644093-Mouse-AntiDehydroepiandrosterone-DHEA-Antibody-Unconjugated/?pda=9776|644093_0_0||6|anti%20DHEA

[023]. Artigos que descrevem a produção de anticorpos monoclonais anti DHEA:

[024]. Parvaz P, Mathian B, Patricot MC, Garcia I, Revol A, Mappus E, Grenot C, Cuilleron CY. Production of monoclonal antibodies to dehydroepiandrosterone-sulphate after immunization of mouse with dehydroepiandrosterone-bovine serum albumin conjugate. **J Steroid Biochem**. 32, p. 553-558, 1989.

[025]. Lewis JG, Bason LM, Elder PA. Production and characterization of monoclonal antibodies to dehydroepiandrosterone sulfate: application to direct enzyme-linked immunosorbent assays of dehydroepiandrosterone sulfate and androsterone/epiandrosterone sulfates in plasma. **Steroids.** 61, p. 682-687, 1996.

[026]. Shrivastav TG, Chaube SK, Kariya KP, Kumari P, Singh R, Kumar D. Influence of different homologous and heterologous combinations of antibodies and enzyme conjugates of dehydroepiandrostosterone on the sensitivity and specificity of DHEA ELISA. **J Immunoassay Immunochem**. 32, p. 114-127, 2011. doi: 10.1080/15321819.2010.543221.

[027]. No que se refere à produção de fragmento de anticorpo scFv ou Fab (Fraction antigen binding) que reconhecem hormônios esteroides, os artigos abaixo são exemplos desse estudo porém, as moléculas diferem quanto ao alvo, modo de produção e aplicação referente à sequência aminoacídica aqui documentada.

[028]. Arevalo JH, Stura EA, Taussig MJ, Wilson IA. Three-dimensional structure of an anti-steroid Fab' and progesterone-Fab' complex. **J Mol Biol**. 231, p.103-118, 1993.

[029]. Kobayashi N, Shibahara K, Ikegashira K, Shibusawa K, Goto J. Single-chain Fv fragments derived from an anti-11-deoxycortisol

antibody. Affinity, specificity, and idiotype analysis. **Steroids**. 67, p. 733-742, 2002. https://doi.org/10.1016/S0039-128X(02)00022-3.

[030]. Valjakka J, Takkinenz K, Teerinen T, Söderlund H, Rouvinen J. Structural insights into steroid hormone binding: the crystal structure of a recombinant anti-testosterone Fab fragment in free and testosterone-bound forms. **J Biol Chem**. 277, p. 4183-4190, 2002. doi: 10.1074/jbc.M105579200.

[031]. Kobayashi N, Kato Y, Oyama H, Taga S, Niwa T, Sun P, Ohtoyo M, Goto J. Anti-estradiol-17beta single-chain Fv fragments: Generation, characterization, gene randomization, and optimized phage display. **Steroids**. 73, p. 1485-1499, 2008. doi: 10.1016/j.steroids.2008.08.009.

[032]. Kobayashi N, Oyama H, Nakano M, Kanda T, Banzono E, Kato Y, Karibe T, Nishio T, Goto J. "Cleavable" hapten-biotin conjugates: preparation and use for the generation of anti-steroid single-domain antibody fragments. **Anal Biochem**. 387, p. 257-266, 2009. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.004.

[033]. Patentes abaixo listadas relatam o desenvolvimento de fragmentos de anticorpos scFv que diferem na constituição aminoacídica, origem, especificidade, reatividade e propriedades do scFv descrito nesse documento.

[034]. **BR 11 2017 018767 1 A2** Dímeros de scfv-fc que ligam o fator de crescimento de transformação beta1 com afinidade, avidez e especificidade altas. **PI 9507594-1** Anticorpo monoclonal com scFv humanizado, molécula de ácido nucleico recombinante e proteína recombinante. **WO2004041863A** Single domain antibodies directed against interferon- gamma and uses therefor. **US5844093A** Anti-EGFR single-chain Fvs and anti-EGFR antibodies. **US7598350B2** Human anti-

epidermal growth factor receptor antibody. **US20040259156A1** Bispecific immunoglobulin-like antigen binding proteins and method of production.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[035]. A invenção a ser protegida por esse documento é caracterizada por ser constituída pelas sequências aminoacídicas que compõem as regiões de complementariedade (CDR) das cadeias leve e pesada de fragmento variável de anticorpo de cadeia simples (scFv) proveniente da clonagem do cDNA codificante de um anticorpo monoclonal murino IgM. Seu uso está relacionado à capacidade de detectar o hormônio dehidroepiandrostenediona (DHEA) em amostras humanas. Esse scFv poderá ser usado para detectar DHEA em casos de puberdade prematura e de tumores da glândula supra-renal em crianças bem como em casos de hirsutismo em adultos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[036]. ***Preparação de conjugados de DHEA.*** DHEA-17-CMO (Steraloids Inc. EUA) foi acoplado a hemocianina de caramujo do inglês *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) baseando-se no protocolo previamente descrito (8). Em resumo, para 10 mg de DHEA-17-CMO, foram adicionados 400 µl de dioxano e dimetilformamida. A esta solução, 100 µl de água contendo 20 mg de NHS e 40 mg de EDAC foram adicionados. A solução resultante foi misturada usando vortex e mantida durante a noite a 4 °C. O esteroide ativado foi adicionado lentamente à solução aquosa de KLH (3,3 mg mL^{-1}) com agitação. O conjugado de DHEA-17-CMO-KLH foi então dialisado contra solução salina tamponada com fosfato a 50 mmol L^{-1} (PBS, pH 7,4) e centrifugado. A concentração de proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford. Alíquotas foram armazenadas a -20 °C até uso posterior. O DHEA conjugado com albumina de soro bovino (DHEA: BSA) foi obtido comercialmente (Steraloids Inc., EUA).

[037]. **Geração do hibridoma.** Após aprovação no comitê de ética animal (CEUA-UFPR no. 643-2014). Quatro camundongos BALB/c foram imunizados com DHEA:KLH por injeção subcutânea (15 µg DHEA: KLH / animal) num total de 4 vezes em intervalos três, duas e uma semana respectivamente. Utilizou-se adjuvante de Freund completo na primeira imunização e incompleto em cada imunização subsequente. Três dias antes da fusão celular, DHEA-KLH (5 µg) em PBS foi injetado por via intravenosa. Três dias após a última imunização, esplenócitos do camungongo hiperimunizado foram fusionados com células de mieloma murino (linhagem celular P3X63Ag8.653) em proporção de 5:1 e centrifugadas. O sedimento celular foi lavado duas vezes com RPMI, ressuspenso e adicionado polietilenoglicol a 50% (PEG) 1500 pré-aquecido (37 °C) gota a gota durante um período de 1 min. As células foram então centrifugadas a 20 ° C durante 5 min a 500 g. O meio hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) foi adicionado e as células foram clonadas por diluições limitantes. Permitiu-se que os hibridomas crescessem durante 15 dias antes da pesquisa por ELISA utilizando DHEA: BSA, BSA, KLH e albumina do soro humano (HSA). Clones positivos para DHEA: BSA, mas não para os outros antígenos foram reclonados e mantidos em cultura até estabilização.

[038]. **Isotipagem e purificação do anticorpo anti-DHEA** foi realizada utilizando o sobrenadante de células de hibridoma e kit IsoStrip® (11493027001, Roche Diagnostics). Os anticorpos do clone 5B7B3C6 foram purificados por uma coluna HiTrap IgM Purification HP pré-embalada com Sepharose High Performance (GE Healthcare Life Sciences).

[039]. **Clonagem de cDNAs codificadores de domínios V de anticorpos e análise in silico.** *O RNA total foi isolado a partir do hibridoma subclonado. Dois lotes independentes foram preparados para garantir a precisão. O cDNA codificador do domínio IGHV foi*

amplificado utilizando primers universais degenerados VHRevU (5'-GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG) e VHForU (5'-GAC AGT GGA TAR ACM GAT GG), o último iniciando para o domínio gama CH1 (Fields *et al.*, 2013). Foram também usados os primers IGH-Rev (5'-CA GGT CAA GCT GCA GCA GTC AGG) e GH-For (5'-AGA GTG GTG CCT TGG CCC CAG) que anelam no final 5'end da IGHV FR1 murina e na 3' do IGHV FR4, respectivalmente (9). A fim de amplificar o cDNA codificador do domínio IGKV de camundongo, foi utilizado o primer VkForU que emparelha a região constante da cadeia kappa com um de cada primer 5 'específico da cadeia kappa (VkRev1 a 9) como recomendado (10). Os produtos de PCR foram purificados com usando o kit PCRapid Invisorb Spin (Invitek, Berlim, Alemanha). O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado e a precisão das seqüências foi confirmada por sequenciamento amplificado de cDNAs após clonagem em pGEM-T Easy vector (Promega). As seqüências foram analisadas *in silico* utilizando as ferramentas IMGT da interface Web e bases de dados (IMGT / DomainGapAlign) (11).

[040]. **Construção, expressão e purificação do scFv anti DHEA.** O gene sintético codificante da cadeia variável pesada do anticorpo monoclonal 5B7B3C6 fusionado ao IGKV por meio de um ligante peptídico (Gly4Ser) 3, contendo um marcador His6 C-terminal foi desenhado com sequência de códons optimizada em Genscript (Piscataway, NJ) para expressão procariótica e locais de restrição terminais (Pst1 / XhoI) escolhido para clonagem em vetor de expressão pSW1 (Ward et al., 1989; Fields et al., 2013). O scFv foi expresso no periplasma de bactérias HB2151 cultivadas em meio 2XTY com ampicilina (0,05 g / L) e induzidas a A600nm = 0,6-0,8 com IPTG (0,8 mmol.L-1) por 16 horas a 16 °C. sob agitação (75 rpm). Após centrifugação(5000 g, 20 min a 4°C, as proteínas periplasmáticas foram recuperadas após choque osmótico leve (tampão TES) e diálise troca

de tampão via diálise contra PBS (pH 7,4). A purificação de scFvs marcados com (His) 6 foi realizada utilizando cromatografia em coluna de níquel. O extracto periplasmático (20 mL) foi incubado com 0,5 mL de Ni2 + -NTA-Agarose (Qiagen, Les Ulis, Fran) durante 2 horas. Após lavagem com PBS, pH 7,4, contendo 20 mmol L^{-1} de imidazol, as proteínas ligadas foram eluídas com 150 mmol L^{-1} de imidazol em frações de 0,5 mL. As frações contendo proteínas foram reunidas e extensivamente dialisadas contra PBS, pH 7,4. As preparações foram analisadas por SDS-PAGE em gel a 12,5% sob condições não redutoras. Para o Western blotting foi utilizado o anticorpo monoclonal Tag 6x-His (Thermo Fisher Antibody MA1-21315). Este passo foi seguido por incubação com um anticorpo anti anticorpo de camundongo conjugado com HRP (A4416, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA). Os imunocomplexos foram então detectados utilizando quimiluminescência ou substrato de diaminobenzidina / cloronaftol (GE Healthcare Life Sciences).

[041]. **ELISA.** Uma placa de poliestireno (Nunc ™ MaxiSorp Thermo Scientific) foi sensibilizada a 4 ° C durante a noite com 100 µL de DHEA: BSA (0,312 a 5 $\mu g.mL^{-1}$) em tampão de carbonato 0,1 $mol.L^{-1}$, pH 9,6. Alternativamente, BSA, KLH e HSA foram utilizados para a sensibilização para verificar se havia reconhecimento inespecífico. Uma quantidade de 150 µl de solução de bloqueio (PBS / 2% BSA) foi adicionada e a microplaca foi incubada por 1 hora a 37°C. Em seguida, o anticorpo monoclonal 5B7B3C6 em diferentes concentrações (2,5, 5, 10 e 20 µg /mL^{-1} em PBS / 0,5% de BSA) foi adicionado aos poços e a microplaca foi incubada por 1 hora a 37°C. Os anticorpos ligados foram detectados pela adição de anticorpo anti- anticorpo de camundongo conjugado com HRP por 1 hora a 37°C. Finalmente, 100 µl da solução de substrato cromogênico (50 mmol L-1 de tampão citrato-fosfato pH 5,0, 0,2 mg mL^{-1} de o-fenilenodiamina e 0,02% (v / v) de peróxido de hidrogênio) foram

adicionados. Após 20 minutos a reação foi interrompida com 20 ul de ácido sulfúrico a 1,0 mol L^{-1} e a absorbância foi lida a 490 nm em leitor ELISA de microplacas (Bio-Rad 550). Pelo menos, três lavagens em PBS / Tween 20 a 0,05% foram realizadas entre cada passo. O ELISA tendo o scFv como anticorpo primário foi realizado sob condições semelhantes de sensibilização, bloqueio e adição de anticorpo primário (diluições sucessivas de extrato periplasmático). Os imunocomplexos foram revelados após incubação com anticorpo monoclonal Tag 6x-His (Thermo Fisher Antibody MA1-21315) durante 90 min a 37°C, seguido de 1 hora de incubação com anticorpo anti-anticorpo de camundongo conjugado com HRP (A4416, Sigma, Saint-Louis, MO, EUA) e desenvolvimento colorimétrico utilizando (50 mmol L^{-1} de tampão citrato-fosfato pH 5,0, 0,2 mg mL-1 de o-fenilenodiamina e 0,02% (v / v) de peróxido de hidrogênio). A reação foi parada com 20 ul de ácido sulfúrico a 1,0 mol L^{-1} e a absorbância foi lida a 490 nm num leitor ELISA de microplacas (Bio-Rad 550). Pelo menos, três passos de lavagem em PBS / Tween 20 a 0,05% foram realizados entre cada passo intermédio.

[042]. **Análise por ressonância plasmônica de superfície (SPR).** O instrumento BIAcore T100 e todos os reagentes foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences, Europa. BSA e DHEA: BSA foram covalentemente ligados a um sensor CM5 (aproximadamente 2545 e 1306 RU, respectivamente). Para rastrear o hibridoma produtor de anticorpos, os sobrenadantes da cultura diluídos 1: 2 em PBS NaCl 150 mM (pH 7,4) foram passados sobre os alvos imobilizados a um fluxo de 30 µL min^{-1}, a 25 ° C, durante 1 min. A regeneração do chip foi realizada após a injeção de guanidina 6M seguida da injeção de NaOH 10 mmol L^{-1} (40 µL/min, 30s) entre as amostras. A cinética de ligação do anticorpo monoclonal ou do scFv ao DHEA:BSA foram avaliados em condições semelhantes mas utilizando o modo cinética de ciclo único. As constantes cinéticas (k_{on}, k_{off}) foram deduzidas a partir da análise das

taxas de associação e dissociação de pelo menos quatro concentrações diferentes de anticorpos. A constante de dissociação KD foi calculada a partir de $K_D = k_{off} / k_{on}$. Os modelos foram analisados usando o software BIAevaluation versão 2.0.2.

[043]. A Tabela 1 apresenta a análise por SPR da interação de scFv5B7 e DHEA-BSA imobilizado no chip. Análise de dados usando modelo heterogêneo.

Tabela 1.

	K_{D1} (nmol L^{-1})	k_{a1} ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{d1} (s^{-1})	K_{D2} (nmolL^{-1})	k_{a2} ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{d2} (s^{-1})	X^2	R_{max1} (RU)	R_{max2} (RU)
Valores	51	$1,73 \cdot 10^4$	$8,8 \cdot 10^{-4}$	555	$9,1 \cdot 10^8$	505,2	8,5	56	76
Erro	1	$1,9 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^{-5}$	10	$7,7 \cdot 10^6$	45			

[044]. **Imunohistoquímica.** A especificidade do anticorpo monoclonal 5B7B3C6 e scFv foi avaliada pelo seu padrão de coloração encontrado em imunohistoquímica usando o kit Spring Bioscience. Utilizaram-se diferentes tecidos embebidos em parafina: adrenal normal de um homem de 41 anos submetido a adrenalectomia por câncer de células claras, carcinoma adrenocortical virilizante (ACC) e fígado de adulto (controle negativo para expressão de DHEA). As amostras de tecidos foram obtidas e aprovadas pelo Comitê de Ética do Hospital Pequeno Príncipe (ACC e fígado, CAAE: 50622315.0.0000.0097) e pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPR (CAAE: 78692617.4.0000.0102). Após desparafinização e reidratação dos tecidos seccionados (4 µm de espessura), a peroxidase endógena foi inativada com solução de peróxido de hidrogênio a 5%. A recuperação antigênica foi realizada deixando as amostras mergulhadas em Immuno Retriever no banho a 99 °C por 40 min. Após arrefecimento e lavagem, as amostras foram incubadas com sobrenadante do hibridoma 5B7B3C6 ou scFv durante a noite a 4 °C na câmara húmida. Todas as lâminas

foram lavadas e incubadas com Enzyme Advance HRP Link durante 30 min à temperatura ambiente, lavadas e coradas com 3, 3-diamino-benzidina e hematoxilina. Com excepção dos ensaios utilizando scFv, as amostras de tecidos foram também incubadas com anticorpo anti-histidina (1: 800, Thermo Fisher) durante 15 min à temperatura ambiente. As imagens de micrografia utilizadas para quantificar a marcação anti-DHEA IgM e scFv foram obtidas com o Axio Scan Z1 (ZEISS ©) com lente de aumento de 40x e ZEN Software v 2.3 (ZEISS ©). A reatividade do anti-DHEA foi quantificada em 20 campos aleatórios de tamanho 64 × 64 µm2 por área adrenal usando o software Image Pro Plus. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos resultados. O teste de Kruskal-Wallis e Dunn foi usado para verificar a diferença na marcação entre as zonas adrenais. $p < 0,05$ foi considerado significativo. A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism v 6.05.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[045]. A Figura 1 apresenta a seleção de hibridomas que secretam anticorpos anti DHEA. (A) Seleção, por ELISA, de sobrenadantes de hibridomas utilizando vários antígenos imobilizados na placa (BSA, DHEA: BSA, KLH, HSA). Barras da esquerda para a direita: hibridoma 2H12, 2F5B7, 5B7C2 e 5B7B3. (B) Análise, por Western blot, de sobrenadantes de hibridomas após SDS-PAGE de BSA (1) ou DHEA: BSA (2). M: Marcador de peso molecular. Análise SPR de sobrenadantes de hibridoma utilizando DHEA: BSA imobilizado em que (C) 5B7B3 (azul), 5B7C2 (vermelho), 2F5B7 (verde), 2H12 (púrpura) sobrenadantes (1:2), e purificado IgM 5B7B3C6 (40 nM) em verde são mostrados. Amostras de anticorpos foram injetadas em t = 0 s e (D) expressão do sinal corrigido.

[046]. A Figura 2 apresenta a clonagem e caracterização de domínios V 5B7. (A) Análise do domínio IGHV: amplificação do RNAm utilizando os iniciadores VHForU e VHRevU (canaleta 2) ou IGH-Rev e IGH-For (canaleta 3) após transcrição reversa ou não (-). (B) Análise do

domínio de IGKV: amplificação por do RNAm usando VkForU e VkRev1 para 9 iniciadores (canaletas 1 a 9). M: 100 pb, padrão de pares de base; (C) "Collier de Perle" das sequências proteicas deduzidas e a identidade da imunoglobulina de camundongo mais semelhante. CDR H1, H2 e H3 são indicados em vermelho, laranja e roxo, respectivamente. As CDR L1, L2 e L3 estão indicadas em azul, verde claro e verde floresta, respectivamente. (D) identidade de CDRs e estrutura canônica relacionada. Os resíduos, numerados de acordo com "Collier de Perle", que diferem entre os dois domínios do IGHV são indicados.

[047]. A Figura 3 apresenta a caracterização funcional do anticorpo monoclonal 5B7. (A) análise de Western blot. 1: BSA e 2: BSA-DHEA. (B) ELISA direto realizado com BSA-DHEA imobilizada (0,25 µg) e diferentes concentrações de IgM (20–0,16 µg mL^{-1}). (C) Análise da interação de 5B7 injetado a 5, 10, 20, 40 nmol L^{-1} com BSA-DHEA imobilizado (vermelho) e BSA (azul).

[048]. A Figura 4 apresenta a expressão e avaliação do scFv 5B7 recombinante por ELISA. (A) Representação esquemática do cassete de expressão. A janela de leitura aberta está sob o controle de um promotor T7 e contém uma sequência sinal pelB para expressão periplasmática, DNAc que codifica VH e VL foram fusionados através de uma sequência "linker" (Gly4Ser) e clonados na sequência pelB. Isto permite a expressão de scFv com um marcador de termo C (His). (B) Análise funcional dos extratos periplasmáticos contendo scFv 5B7 utilizando concentrações crescentes de DHEA-BSA imobilizada. (C) Electroforese (esquerda) e Western blotting (direita) do scFv5B7. M: marcadores de massa molecular; (1) fração de fluxo (2) extrato periplasmático; (3) scFv purificado por coluna de níquel.

[049]. A Figura 5 apresenta a análise por SPR da interação entre DHEA-BSA e scFv 5B7 purificado. (A) O chip foi revestido com BSA-DHEA

(laranja) ou BSA (azul). (B) Sinal corrigido ajustado com o modelo heterogêneo. (C) scFv 5B7 foi pré-incubado com concentrações crescentes de cortisol livre e depois injetado a 150, 300, 600, 1200 e 2400 nmol L^{-1} em modo contínuo.

[050]. A Figura 6 apresenta a Imunohistoquímica, utilizando-se moléculas anti-DHEA em uma secção do tecido do córtex adrenal. Normal adrenal de um homem de 41 anos (A) testado com anti-DHEA IgM (esquerda) e anti-DHEA scFv (direita). O quadrado pontilhado indica a área ampliada mostrada em (B) confirmando a especificidade na detecção de DHEA na zona reticular (ZR) (C) convertida em pontos vermelhos (D e E). Os quadrantes apresentados em (D) correspondem a áreas de quantificação média para cada zona adrenal (ZG, GF, ZR e M) (E). As amostras de tecido foram contra-coradas utilizando a hematoxilina. ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculada; ZR: zona reticular e M: medula adrenal. Barra branca: 200 µm, barra preta: 500 µm.

REFERÊNCIAS

1. Prough RA, Clark BJ, Klinge CM. Novel mechanisms for DHEA action. J Mol Endocrinol [Internet]. 2016 Apr;56(3):R139–55. Available from: https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/56/3/R139.xml
2. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and Functional Biology of the Primate Fetal Adrenal Cortex 1. Endocr Rev [Internet]. 1997 Jun 1;18(3):378–403. Available from: http://dx.doi.org/10.1210/edrv.18.3.0304
3. Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. Trends Endocrinol Metab [Internet]. 2002 Jul 1;13(5):200–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00602-1
4. Havelock JC, Auchus RJ, Rainey WE. The Rise in Adrenal Androgen Biosynthesis: Adrenarche. Semin Reprod Med [Internet]. 2004 Nov;22(04):337–47. Available from: http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2004-861550
5. Ribeiro RC, Michalkiewicz EL, Figueiredo BC, Delacerda L, Sandrini F, Pianovsky MD, et al. Adrenocortical tumors in children. Brazilian J Med Biol Res. 2000;
6. Custódio G, Komechen H, Figueiredo FRO, Fachin ND, Pianovski MAD, Figueiredo BC. Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil. Mol Cell Endocrinol. 2012;
7. Custódio G, Parise GA, Filho NK, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. J Clin Oncol. 2013;
8. Shrivastav TG, Chaube SK, Kariya KP, Kumar D, Pandit D, Kumari P, et al. Influnce of different length linker containing DHEA-7-CMO-

enzyme conjugates on sensitivity and specificity of DHEA-17-CMO-antibody. J Immunoass Immunochem. 2011;

9. Mousli M, Goyffon M, Billiald P. Production and characterization of a bivalent single chain Fv/alkaline phosphatase conjugate specific for the hemocyanin of the scorpion Androctonus australis. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 1998;
10. Fields C, O'Connell D, Xiao S, Lee GU, Billiald P, Muzard J. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. Nat Protoc [Internet]. 2013 Jun 16;8(6):1125–48. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.057
11. Ehrenmann F, Giudicelli V, Duroux P, Lefranc M-P. IMGT/Collier de Perles: IMGT Standardized Representation of Domains (IG, TR, and IgSF Variable and Constant Domains, MH and MhSF Groove Domains). Cold Spring Harb Protoc [Internet]. 2011 Jun 1;2011(6):pdb.prot5635-pdb.prot5635. Available from: http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.prot5635

REIVINDICAÇÕES

1. **Fragmento variável de cadeia simples (scFv) de anticorpo que reconhece o hormônio dehidroepiandrosterona (DHEA) humano**, caracterizado por: *i)* uma cadeia variável leve (VL, do inglês variable light chain) *ii)* uma cadeia variável pesada (VH, do inglês variable heavy chain) *iii)* um peptídeo juncional entre a cadeia variável dita pesada e a cadeia dita leve.

2. **Fragmento variável de cadeia simples (scFv)**, de acordo com a reivindicação 1, em que a cadeia dita pesada (VH) compreende às regiões determinantes de complementariedade ou CDR (do inglês "complementarity determining regions") 1, 2 e 3 (CDR1, CDR2 e CDR3), caracterizadas por serem constituídas pelas sequências de aminoácidos SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2 e SEQ ID Nº 3, respectivamente ou sequências apresentando pelo menos 95% de identidade.

3. **Fragmento variável de cadeia simples (scFv)**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, em que a cadeia dita leve (VL) compreende as regiões determinantes de complementariedade ou CDR (do inglês "complementarity determining regions") 1, 2 e 3 (CDR1, CDR2 e CDR3), caracterizadas por serem constituídas pelas sequências de aminoácidos SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6, respectivamente ou sequências apresentando pelo menos 95% de identidade.

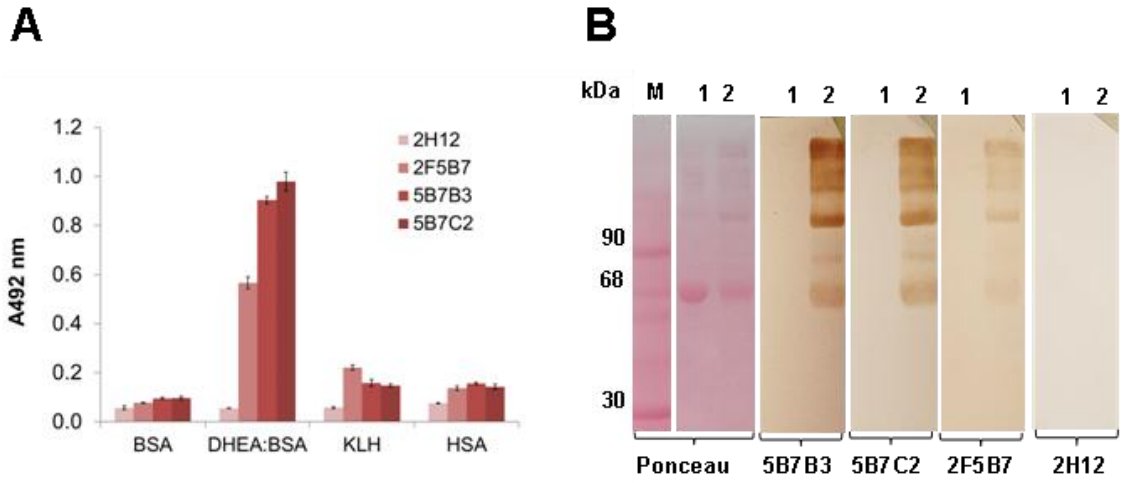
4. **Fragmento variável de cadeia simples (scFv),** de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, em que o peptídeo dito juncional é caracterizado pela sequência aminoacídica SEQ ID Nº 7.

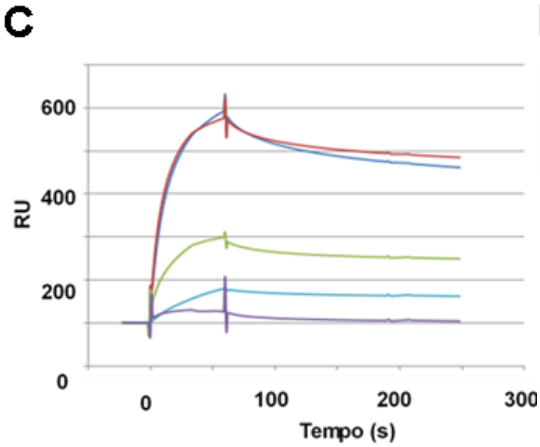
5. **Fragmento variável de cadeia simples (scFv)**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por constituir formas recombinantes de anticorpo seja Fab', Fab'$_2$ ou combinações VH e VL por meio de produção recombinante.

6. **Fragmento variável de cadeia simples (scFv)**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por estar conjugado com molécula marcadora colorimétrica para uso na detecção de DHEA no soro ou biópsia tecidual humana.

7. **Fragmento variável de cadeia simples (scFv)**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por estar presente em composição farmacêutica compreendendo à proteína recombinante acoplada a agente quimioterápico ou radioterápico para uso no reconhecimento de DHEA humano e um veículo farmaceuticamente aceitável.

FIGURA 1





D

Sobrenadante	5B7B3	5B7C2	2F5B7	2H12
BSA	134	199	219	51
DHEA-BSA	593	654	400	69
Sinal corrigido	459	455	181	18
Especificidade (%)	77,4	69,6	45,2	26,1

FIGURA 2

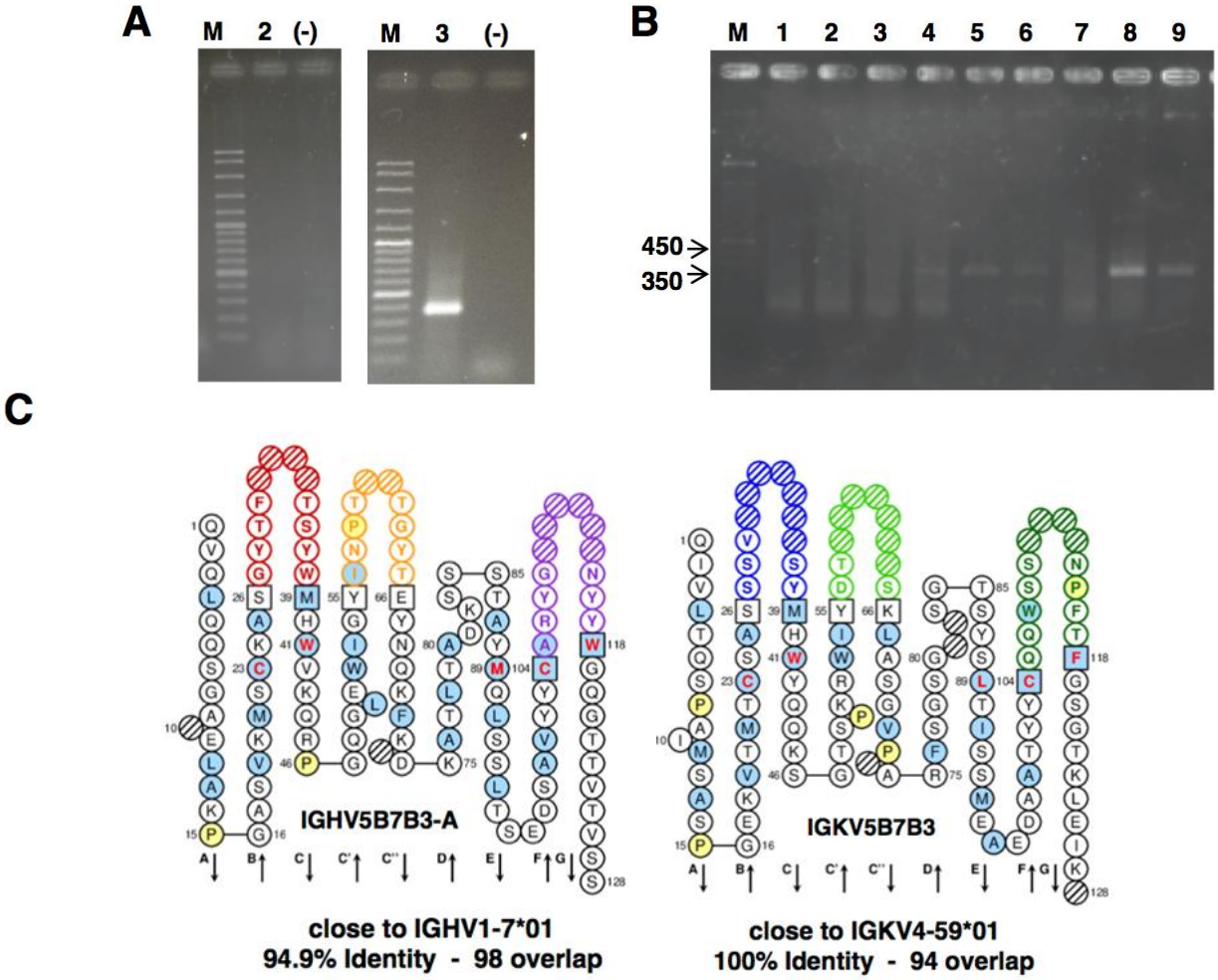

A
M 2 (-)
M 3 (-)
B
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
450
350
C
IGHV5B7B3-A
close to IGHV1-7*01
94.9% Identity - 98 overlap
IGKV5B7B3
close to IGKV4-59*01
100% Identity - 94 overlap

FIGURA 3

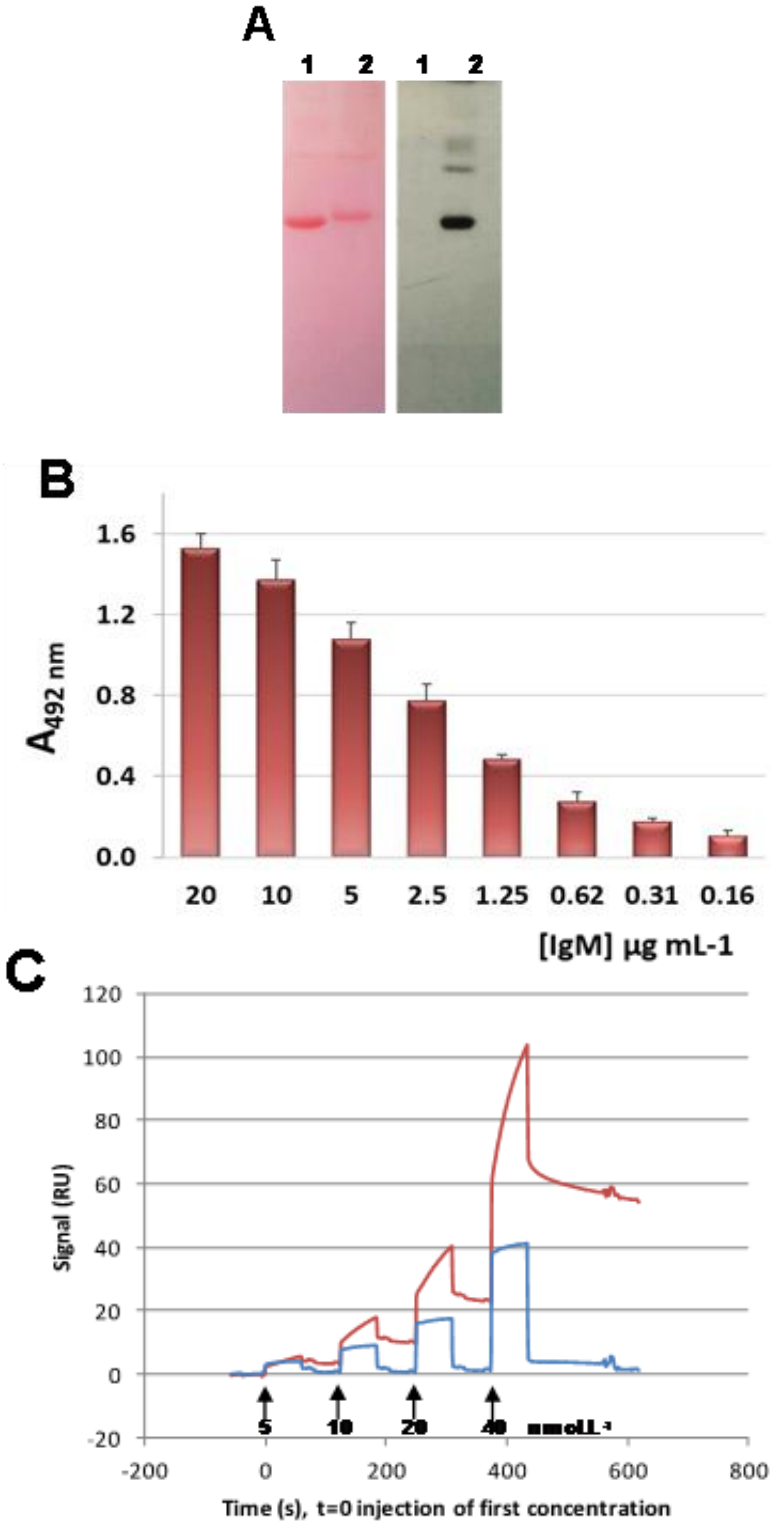

A
1 2 1 2
B
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
A492 nm
20 10 5 2.5 1.25 0.62 0.31 0.16
[IgM] µg mL-1
C
120
100
80
60
40
20
0
-20
Signal (RU)
5 10 20 40 nmol.L-1
-200 0 200 400 600 800
Time (s), t=0 injection of first concentration

FIGURA 4

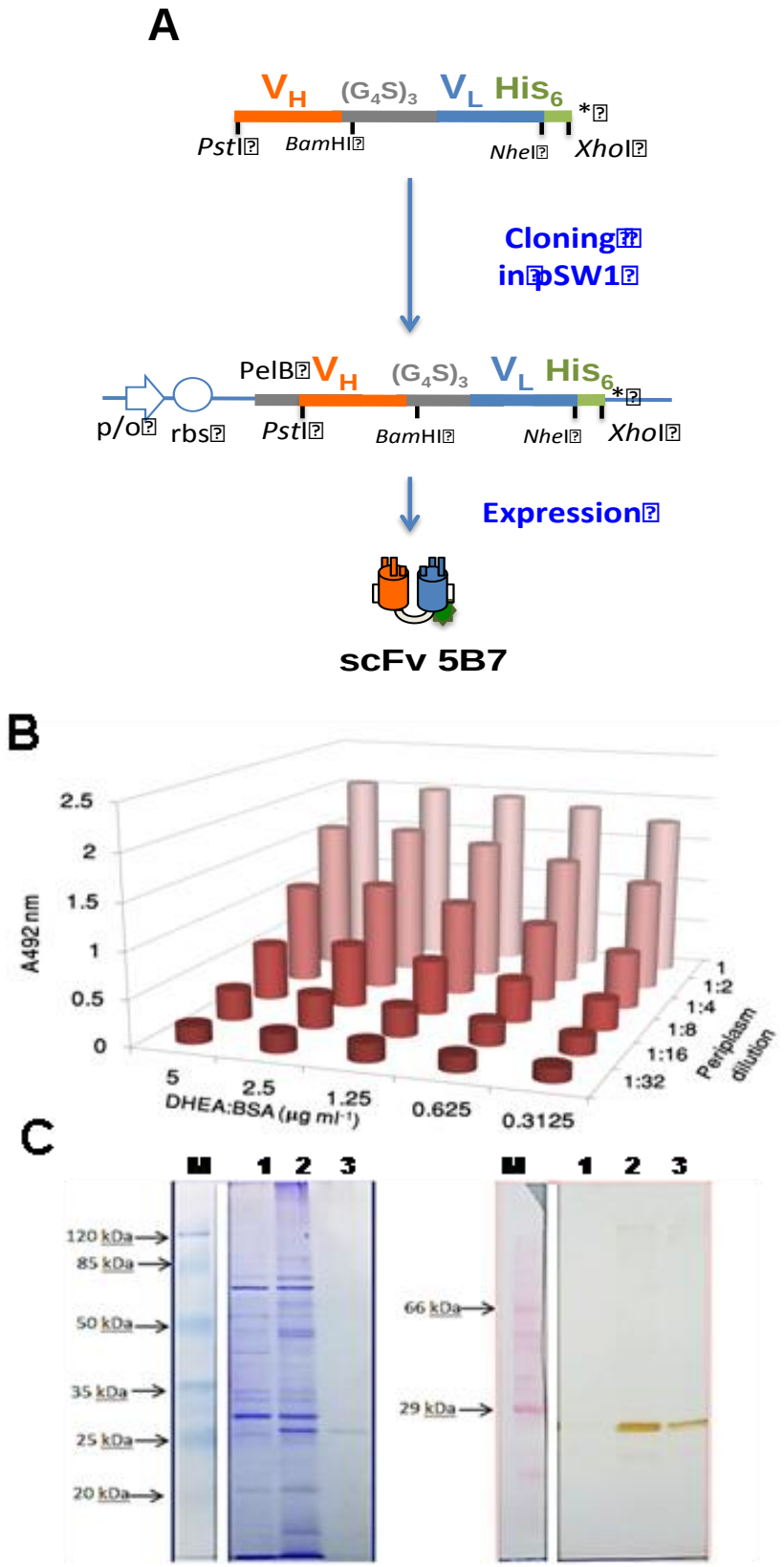

A
VH
(G4S)3
VL
His6
*
PstI
BamHI
NheI
XhoI
Cloning
in pSW1
PelB
VH
(G4S)3
VL
His6
*
p/o
rbs
PstI
BamHI
NheI
XhoI
Expression
scFv 5B7
B
A492 nm
2.5
2
1.5
1
0.5
0
5
2.5
1.25
0.625
0.3125
DHEA:BSA (µg ml-1)
1
1:2
1:4
1:8
1:16
1:32
Periplasm dilution
C
M
1
2
3
120 kDa
85 kDa
50 kDa
35 kDa
25 kDa
20 kDa
M
1
2
3
66 kDa
29 kDa

FIGURA 5

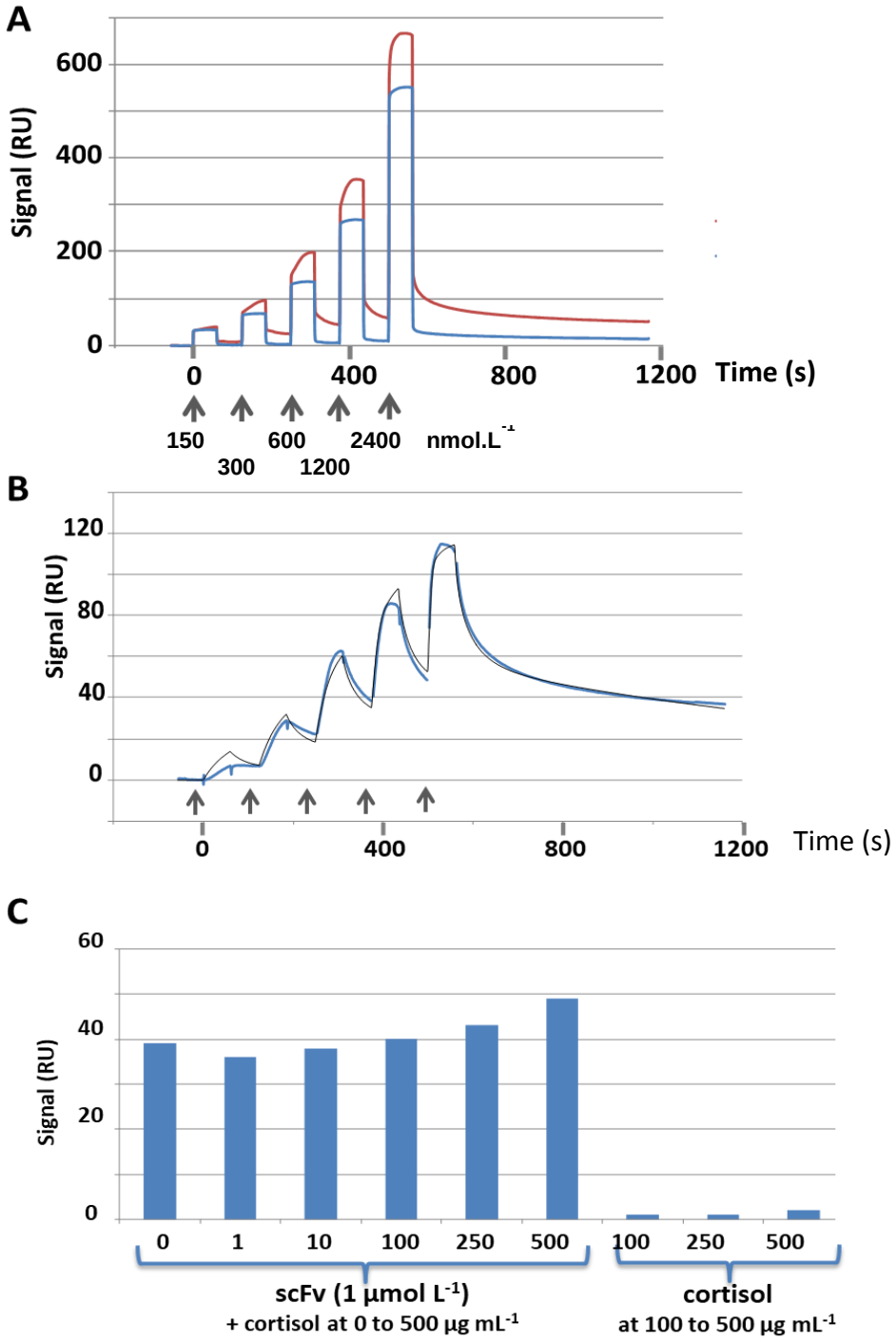
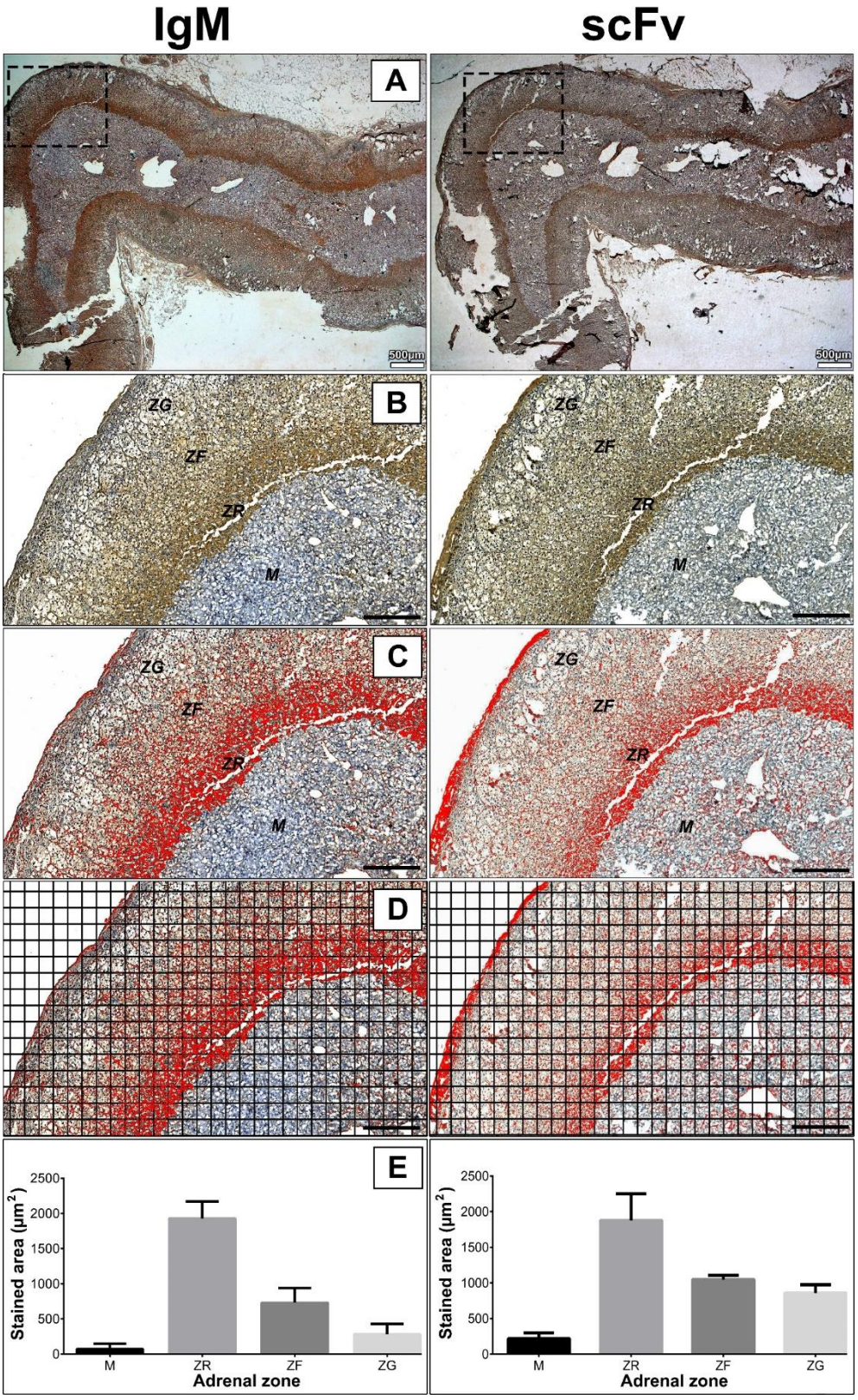

A
Signal (RU)
600
400
200
0
0
400
800
1200
Time (s)
150
300
600
1200
2400
nmol.L-1
B
Signal (RU)
120
80
40
0
0
400
800
1200
Time (s)
C
Signal (RU)
60
40
20
0
0
1
10
100
250
500
100
250
500
scFv (1 µmol L-1)
+ cortisol at 0 to 500 µg mL-1
cortisol
at 100 to 500 µg mL-1

FIGURA 6


IgM
scFv
A
500µm
B
ZG
ZF
ZR
M
C
D
E
Stained area (µm²)
2500
2000
1500
1000
500
0
M
ZR
ZF
ZG
Adrenal zone

RESUMO

"Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo murino em sua forma recombinante detecta hormônio DHEA em amostras humanas"

O hormônio dehidroepiandrosterona é um marcador de carcinoma adrenocortical (CAC), pois o seu aumento na circulação pode ser proporcional à massa tumoral, por isso o interesse em desenvolver uma molécula capaz de detectar o hormônio. Para tanto, o hormônio DHEA foi conjugado com KLH e usado como imunógeno para obter hibridomas, de origem murina, anti-DHEA. Dos hibridomas secretores de imunoglobulina M (IgM) específica para o DHEA, foram obtidos RNAs mensageiros (RNAm) codificantes da cadeia leve e pesada do anticorpo IgM denominado 5B7. Esse RNAm foi usado como molde para a síntese de fita de DNA complementar (cDNA) o qual foi sequenciado e clonado em vetor de expressão de proteínas. Como produto obteve-se uma proteína recombinante que consiste no scFv que reconhece a molécula de DHEA de maneira muito semelhante à molécula parental. O scFv recombinante provou-se ser eficiente na detecção de DHEA no tecido adrenal normal e nas células de CAC permitindo a localização tecidual do DHEA.

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

Código de Controle

Campo 1

F4CD6B2004F3FB18

Campo 2

67DC6678277E9470

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Lista de sequencias scFv DHEAv1.txt
- Data de Geração do Código: 18/12/2018
- Hora de Geração do Código: 09:07:00
- Código de Controle:
    - Campo 1: F4CD6B2004F3FB18
    - Campo 2: 67DC6678277E9470