

Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos

Campo da Invenção

[001] A presente invenção está relacionada ao campo da biologia molecular aplicada à medicina e à saúde pública. Esse documento destaca a sequência aminoacídica e nucleotídica de uma molécula recombinante de anticorpo conjugada a um marcador colorimétrico (fosfatase alcalina, FA) que é capaz de identificar o veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* em fluidos biológicos. Essa molécula recombinante pode ser particularmente usada no diagnóstico de pacientes que sofreram acidentes de envenenamento (loxoscelismo) causados por essas aranhas.

Fundamentos e Histórico da Invenção

[002] Aranha "reclusa", "violonista" ou "do violino" na América do Norte ou simplesmente, aranha "marrom" na América do Sul, são alguns nomes populares usados para se referir aos aracnídeos do gênero *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae), embora eles possam ser encontrados em todo o mundo (Vetter e Isbister, 2008).

[003] O gênero *Loxosceles* compreende mais de 100 espécies (N, 2013) e todas elas tem, provavelmente, capacidade de produzir picadas que comprometem a saúde humana. A principal aranha responsável por envenenamentos no Estados Unidos é a *Loxosceles reclusa* (Futrell, 1992), enquanto *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* são consideradas as mais importantes do ponto de vista médico na América do Sul, especialmente no Brasil, embora outras espécies também tenham sido encontradas (Silvestre *et al.*, 2005; Gonçalves-De-Andrade *et al.*, 2012). Em território brasileiro, o envenenamento pela aranha marrom é considerado como uma séria ameaça à saúde pública, devido ao número de casos notificados anualmente. Em 2012, 25.329 acidentes com esse aracnídeo foram registrados. Estima-se que

aproximadamente 50% destes são causados por aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles* (Malaque *et al.*, 2011).

[004] Normalmente, o quadro clínico do loxoscelismo é uma síndrome necrosante-hemolítica que começa com edema e isquemia no local da picada seguido por necrose (escara) dentro de alguns dias que, ocasionalmente, se estende por semanas. Um pequeno número de pacientes pode ter uma resposta sistêmica mais grave com hemólise e com anemia subsequente, insuficiência renal e hematúria, que pode ser mais pronunciada em crianças (Hogan *et al.*, 2004; Swanson e Vetter, 2006).

[005] O diagnóstico do Loxoscelismo não é fácil tendo em vista que os acidentes, muitas vezes, passam despercebidos. Os primeiros sinais clínicos não são específicos e, após o aparecimento da necrose, muitas vezes, não há intervenções clínicas capazes de reverter o quadro clínico. Por isso o diagnóstico correto e precoce é importante para definir qual o tratamento a ser seguido.

[006] Portanto, imunoenaios de laboratório devem ser desenvolvidos e aplicados junto a testes clínicos convencionais, a fim de facilitar a detecção específica das toxinas em fluidos biológicos. Tais imunoenaios, como o ELISA, são normalmente desenvolvidos utilizando anticorpos convencionais (policlonais ou monoclonais). Porém o uso dessas moléculas tem algumas desvantagens: (i) dificuldade de manutenção de uma fonte reprodutível de anticorpos policlonais; (ii) a produção de anticorpos monoclonais a partir de hibridomas é trabalhoso e requer instalações onerosas de cultura celular e, finalmente, (iii) anticorpos monoclonais são moléculas com especificidade e afinidade fixas que não podem ser alteradas para melhorar essas características.

[007] O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de um produto caracterizado por ser uma sequência nucleotídica de um fragmento de anticorpo capaz de detectar o veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* em fluidos biológicos.

[008] Aqui, nesse documento, relata-se uma fonte reprodutível de fragmentos de anticorpos provenientes de um gene sintético composto pela

sequência nucleotídica a ser patenteada, que requer pouca infraestrutura e com características que podem ser alteradas a partir da caracterização estrutural de um fragmento recombinante de um anticorpo monoclonal chamado de LiMab7 (sigla a partir do inglês: *Loxosceles intermedia* monoclonal antibody 7) capaz de reconhecer componentes do veneno de *L. intermedia* e inibir suas ações tóxicas em organismo vivo (Alvarenga *et al.*, 2003).

[009] Devido as suas características, este anticorpo foi o material de partida utilizado para a concepção do fragmento variável de cadeia simples (scFv) de anticorpo (do inglês *single chain variable fragment*) de elevado potencial diagnóstico e terapêutico conjugado a um marcador colorimétrico (fosfatase alcalina - FA) e produzido em de *Escherichia coli*. Por métodos de engenharia genética, o gene que codifica para este scFv LiMab7 foi construído e inserido em um vetor para a expressão procariótica fusionado ao gene da fosfatase alcalina (FA), uma proteína dimérica. A proteína de fusão (scFv-LiMab7/FA) foi produzida por bactérias como um dímero que imita uma molécula de imunoglobulina G (IgG) natural em que todos os domínios constantes foram substituídos pela forma dimérica da proteína FA. Esse fragmento de anticorpo mesmo fusionado à FA continuou a se ligar especificamente ao antígeno como a molécula original. Essa estratégia de ligar o fragmento de anticorpo a um marcador tem a vantagem de possibilitar o desenvolvimento de imunoenaios mais rápidos que os convencionais, como o descrito nesse documento.

[010] Dessa forma, utilizando-se um fragmento de anticorpo ligado a uma molécula colorimétrica como a fosfatase alcalina, foi possível desenvolver um ELISA simples que permite a detecção de componentes do veneno de *Loxosceles intermedia* em fluidos biológicos utilizando o conjugado scFv-LiMab7 recombinante/FA. Tal bioferramenta pode ser valiosa para o desenvolvimento de imunoenaios robustos que facilitem diagnóstico do loxoscelismo de maneira rápida e confiável.

Estado da Arte

[011] São muitos os estudos científicos que se referem à produção de scFv que possuem afinidade por componentes de venenos de animais peçonhentos porém, essas moléculas diferem quanto ao alvo, modo de produção e aplicação (Alvarenga *et al.*, 2014) daquele relatado por Jiacomini e colaboradores (Jiacomini *et al.*, 2016) referente à sequência nucleotídica aqui documentada.

i. artigos científicos abaixo citados relatam anticorpos monoclonais que reconhecem e/ou neutralizam toxinas do veneno de outras aranhas do gênero *Loxosceles*, como *L. gaucho*, *L. laeta* e ainda *L. intermedia* mas que diferem do anticorpo monoclonal que origina a molécula descrita no presente documento quanto à especificidade, reatividade e propriedades imunoquímicas.

Guilherme P et al. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. *Toxicon*, 39(9):1333-42, 2001.

Dias-Lopes C et al. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. *Vaccine*, 11;32(18):2086-92, 2014.

ii. artigos científicos abaixo citados relatam fragmentos de anticorpos, scFv, que reagem com toxinas de outros animais peçonhentos, como escorpiões e serpentes, e diferem na constituição aminoacídica, origem, especificidade, reatividade e propriedades da molécula descrita no presente documento.

Mousli, M. et al. Production and characterization of a bivalent single chain Fv/alkaline phosphatase conjugate specific for the hemocyanin of the scorpion *Androctonus australis*. *Biochim Biophys Acta*, 1425(2):348-60, 1998.

Mousli, M. et al. A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis* hector. *FEBS Lett*, 15;442(2-3):183-8, 1999.

Riaño-Umbarila L et al. Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *J Biol Chem*, 25;286(8):6143-51, 2011.

Castro JM et al. A neutralizing recombinant single chain antibody, scFv, against BaP1, A P-I hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 87:81-91, 2014.

Riaño-Umbarila L et al. Optimal neutralization of centruroides noxius venom is understood through a structural complex between two antibody fragments and the Cn2 toxin. *J Biol Chem*, 22;291(4):1619-30, 2016.

Rodríguez- Rodríguez ER et al, Broadening the neutralizing capacity of a family of antibody fragments against different toxins from Mexican scorpions. *Toxicon*, 20;119:52-63, 2016.

iii. artigos científicos abaixo citados relatam o desenvolvimento de fragmentos de Fab de anticorpos reagentes contra toxinas de animais peçonhentos, como escorpião, e diferem na constituição aminoacídica, origem, especificidade, reatividade e propriedades da molécula descrita no presente documento.

Abrey N et al. Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin Aahl, and functional evaluation versus other antibody fragments. *Toxicon*, 1;43(3):233-41, 2004.

Selisko B et al. Bacterial expression, purification and functional characterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius hoffmann*. *Toxicon*, 43(1):43-51, 2004.

- iv. **artigos científicos abaixo citados relatam o desenvolvimento de fragmentos de anticorpos reagentes contra toxinas de animais peçonhentos, como escorpiões utilizando a técnica de Phage Display, diferente da empregada nesse documento, e ainda obtendo fragmentos de anticorpos que diferem na constituição aminoacídica, origem, especificidade, reatividade e propriedades da molécula descrita no presente documento.**

Juárez-González VR et al. Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2. *J Mol Biol*. 11;346(5):1287-97, 2005.

Riaño-Umbarila L et al. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J*, 272(10):2591-601, 2005.

Uste M et al. Using a recombinant bispecific antibody to block Na⁺-channel toxins protects against experimental scorpion envenoming. *Cell Mol Life Sci*, 64(2):206-18, 2007.

Riano-Umbarila L et al. A novel human recombinant antibody fragment capable of neutralizing Mexican scorpion toxins. *Toxicon*, 15;76:370-6, 2013.

v. artigos científicos abaixo citados relatam o desenvolvimento de nanobodies de camelídeos e os mesmos fragmentos de anticorpos desta vez humanizados reagentes contra toxinas de animais peçonhentos, como escorpiões que diferem na constituição aminoacídica, origem, especificidade, reatividade e propriedades da molécula descrita no presente documento.

Hmila I et al. VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin Aahl'. *Mol Immunol*, 45(14):3847-56, 2008.

Hmila I et al. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J*, 24(9):3479-89, 2010.

Ben Abderrazek R et al. Development of Cys38 knock-out and humanized version of NbAahl10 nanobody with improved neutralization of Aahl scorpion toxin. *Protein Eng Des Sel*, 24(9):727-35, 2011.

Yardehnavi N et al. A camelid antibody candidate for development of a therapeutic agent against *Hemiscorpius lepturus* envenomation. *FASEB J*, 28(9):4004-14, 2014.

vi. artigos científicos abaixo citados relatam o desenvolvimento de diabodies reagentes contra toxinas de animais peçonhentos, como escorpiões, que diferem na constituição aminoacídica, origem, especificidade, reatividade e propriedades da molécula descrita no presente documento.

di Tommaso A et al. Diabody mixture providing full protection against experimental scorpion envenoming with crude *Androctonus australis* venom. *J Biol Chem*, 20;287(17):14149-56, 2012.

vii. artigos científicos abaixo citados relatam o desenvolvimento de scFv humanizado contra toxinas de animais peçonhentos, como escorpiões e serpentes, que diferem na constituição aminoacídica, origem, especificidade, reatividade e propriedades da molécula descrita no presente documento.

Tamarozzi MB et al. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. *Biochim Biophys Acta*, 1760(9):1450-7, 2006.

Oliveira JG et al. Expression of human recombinant antibody fragments capable of partially inhibiting the phospholipase activity of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 105(2):84-91, 2009.

Amaro I et al. Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion. *Immunol Lett*, 30;139(1-2):73-9, 2011.

Pucca MB et al. Serrumab: a human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of Tityus serrulatus venom. *J Immunotoxicol*, 9(2):173-83, 2012.

Pucca MB et al. Serrumab: a novel human single chain-fragment antibody with multiple scorpion toxin-neutralizing capacities. *J Immunotoxicol*, 11(2):133-40, 2014.

Danpaiboon W et al. Ophiophagus hannah venom: proteome, components bound by Naja kaouthia antivenin and neutralization by N. kaouthia neurotoxin-specific human ScFv. *Toxins (Basel)*, 13;6(5):1526-58, 2014.

viii. artigos científicos abaixo citados relatam o desenvolvimento de scFv conjugados a moléculas colorimétricas na detecção de proteínas ou toxinas de animais peçonhentos, como escorpiões, que diferem na constituição aminoacídica, origem, especificidade, reatividade e propriedades da molécula descrita no presente documento.

Mousli M et al. Production and characterization of a bivalent single chain Fv/alkaline phosphatase conjugate specific for the hemocyanin of the scorpion *Androctonus australis*. *Biochim Biophys Acta*, 23;1425(2):348-60, 1998.

Aubrey N et al. A recombinant scFv/streptavidin-binding peptide fusion protein for the quantitative determination of the scorpion venom neurotoxin Aahl. *Biol Chem*, 382(11):1621-8, 2001.

Aubrey N et al. Rapid immunotitration of individual toxins from *Androctonus australis* venom. *Bull Soc Pathol Exot*, 95(3):194-6, 2002.

ix. Patentes abaixo listadas relatam o desenvolvimento de fragmentos de anticorpos scFv mas que diferem na constituição aminoacídica, origem, especificidade, reatividade e propriedades do scFv descrito no presente documento.

EP 1916259 A1 - Fragmento scFv anti glicoproteína VI para o tratamento de trombose. Trata-se de um fragmento de anticorpo proveniente de um anticorpo monoclonal chamado de 9012.2.2 desenvolvido contra a glicoproteína VI

WO 2013173820 A2 - ScFv biespecífico para imunodifusão (BIF). Trata-se de um fragmento de anticorpo que tem a capacidade de se ligar a uma célula tumoral, por exemplo, e ainda se ligar a um linfócito T citotóxico aproximando essas células e facilitando a morte da primeira.

WO2008/006235 - Fragmento de anticorpo scFv que tem propriedade de aumentar a penetração tecidual de um medicamento tópico por exemplo.

CA 2693137 - Fragmento de anticorpo scFv que reconhece o vírus herpes bovina tipo I, possui atividade neutralizante e que é capaz de ser usado em métodos de diagnóstico.

US2012064077 - Trata-se de um fragmento de anticorpo solúvel e estável capaz de inibir TNF-alfa e ainda com baixa imunogenicidade. Indicados para serem utilizados no tratamento de desordens em que o TNF alfa é importante.

US 20070071750 A1 - Trata-se de variantes de anticorpo humano que reconhecem e neutralizam a toxina CN2 do escorpião *Centruroides noxius*.

Descrição da abordagem do problema técnico

[012] O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de um produto obtido de forma recombinante, ou seja, em bactérias, caracterizado por ser um fragmento variável de cadeia simples de anticorpo LimAb7 ligado a um agente colorimétrico, a fosfatase alcalina de aplicação em teste imunológico com menor número de etapas de execução para a detecção de componentes do veneno da aranha marrom em fluidos biológicos (Jiacomini *et al.*, 2016).

[013] Não foram produzidos e caracterizados até o momento fragmentos de anticorpos recombinantes para detecção de venenos de serpentes ou aranhas, somente de peçonhas de escorpiões.

[014] A primeira descrição da produção e emprego de scFv para detecção e quantificação de toxinas presentes no veneno da aranha *L. intermedia* e feita neste trabalho. Para tanto, o DNAc que codifica os genes das cadeias variáveis leve e pesada IGHV e IGV dp LiMab7 foram amplificados por PCR e sequenciadas (Figura 1ª). O LimAb7 é uma IgG1 com cadeia leve kappa.

[015] Após sequenciamento, as sequências aminoacídicas da cadeia leve e pesada foram deduzidas e analisadas usando o software IMGT. Esta análise indicou que a clonagem foi bem sucedida sendo os domínios CDRs (do inglês **complementary-determining regions**), típicos de anticorpos, facilmente identificados, não havendo nenhuma mutação, sugerindo que as sequências reorganizadas foram funcionais (Figuras 1A e 1B).

[016] O gene IGHV pertence à família IGHV1 e mostra 98% de identidade de sequência de anticorpos de *Mus musculus* IGHV1-82*01 enquanto o gene IGKV pertence à família IGKV8 com 82,7% de identidade com *Mus musculus*

IGKV8-28* 01. A partir disso, um modelo tridimensional foi construído, pois é um pré-requisito para uma análise mais aprofundada das propriedades funcionais (Figura 2A).

[017] Em seguida, o gene que codifica o scFv composto do domínio LiMab7 IGHV associado ao domínio IGKL através de um ligante flexível curto (Gly4Ser)₃ foi sintetizado após a otimização de codons de modo a facilitar a alta expressão periplasmática recombinante em células procarióticas. Os sítios de restrição foram introduzidos na extremidade 3' e 5' para facilitar a clonagem em pLip6 / GN vector e gerar um imunocombinado que consiste do scFv LiMab7 fusionado na extremidade C-terminal com FA, como representado nas Figuras 2B e 2C.

[018] O plasmídeo recombinante contendo o gene de scFv LiMab7 foi usada para transformar *Escherichia coli* XL1-blue. Um único clone foi selecionado, cultivado e induzido para a expressão da proteína recombinante. As proteínas periplasmáticas foram extraídas por meio de choque osmótico a frio e depois analisados por SDS-PAGE (Figura 3A). Para confirmar a expressão da proteína de scFv LiMab7/FA, foi realizada uma transferência passiva das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, a membrana foi colocada em contato com o substrato da enzima FA. Uma banda 75 kDa pode ser vista na Figura 3B, indicando atividade da FA expressa no periplasma de bactérias portadoras do plasmídeo pLip6 / GN contendo o scFv-LiMab7. Nenhum produto de degradação foi revelado e nenhuma atividade enzimática endógena foi detectada.

[019] Para se verificar possíveis reações cruzadas, veneno de três espécies de *Loxosceles* foram submetidos à eletroforese (Figura 4A à esquerda), transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com as preparações periplasmáticas bacterianas contendo a proteína recombinante scFv-LiMab7/FA (Figura 4A à direita). Nesta mesma figura, é possível notar que o scFv-LiMab7/FA também reconhece a toxina recombinante rLiD1. Todos esses resultados confirmam a bifuncionalidade da proteína recombinante scFv-LiMab7/FA que além de ser um marcador, preserva o perfil de reconhecimento

do anticorpo original (LimAb7, molécula inteira) analisado sob condições semelhantes (última canaleta da Figura 4A à direita).

[020] Para se avaliar a sensibilidade do scFv-LiMab7/FA na detecção do veneno de *L. intermedia*, parâmetros de um ELISA de competição usando a proteína recombinante rLiD1 imobilizada foram otimizados. Uma curva típica de competição para o veneno de *L. intermedia* é mostrada na Figura 4B. A concentração média de veneno necessária para uma inibição de 50% da ligação foi de 1,25 µg/mL e o limite de detecção do ensaio foi considerado 0.156 µg/mL de veneno (10% concentração de inibição) (Tabela 1). No ELISA sanduíche (Figura 4C) a concentração média de veneno necessária para 50% de ligação foi 0.625 µg/mL e o limite de detecção do ensaio foi significativamente melhorada (0.039 µg/mL).

Tabela 1: Características analíticas do ELISA de competição e sanduíche para a detecção do veneno de *L. intermedia*

Parâmetros	ELISA de competição	ELISA sanduíche
Antígeno na placa (mg/poço)	0.0005	0.010
Atividade da fosfatase alcalina (UI) no extrato periplasmático	530	530
IC ₅₀ ou 50% de inibição (µg/mL)	1.25	0.625
Limite de detecção (µg)	0.156	0.039
Curva de linearidade (µg/mL)	0.156 – 1.0	0.039 – 2.0
Duração do ensaio (min)	120 min	180 min

Descrição detalhada da Invenção

Clonagem do cDNA do LimAb7

[021] RNA total do hibridoma do LimAb7 foi isolado a partir de células em cultura que secretavam anticorpos LimAb7. anIgG1k.cDNAs que codificam os

domínios variáveis de anticorpo (IGHV e IGKV) foram clonados após a RT-PCR utilizando iniciadores degenerados IGH-Por (GAC AGT GGA GAT GG TAR ACM) e IGH-Rev (GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG) para amplificação e seqüenciamento do LimAb7 IGHV e V- KAPPA Rev (CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT) e V-KAPPAFor (GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC) para amplificação e seqüenciamento do LimAb7 IGKV. Em seguida, o gene sintético que codifica LimAb7 IGHV foi fusionado ao LimAb7 KAPPA através de um peptídeo ligante ("linker") composto por glicerinas e serinas (Gly4Ser)₃ com sequências de codons otimizados para a expressão procariótica (SEQ ID N° 8). Os locais de sítio de restrição foram escolhidos para possibilitar a clonagem em vários vetores de expressão (pLip6 / GN, pET22b (+) entre outros) como descrito previamente (Fields *et al.*, 2013).

Síntese e construção do vetor de expressão

[022] O DNAC que codifica o scFv-LimAb7 e vector de expressão procariótico pLIP6/GN foram digeridos com as enzimas de restrição Sfil e NotI. Após a ligação, o produto foi transformado em *E. coli*XL1-Blue. Todos os procedimentos básicos de biologia molecular foram realizados como descrito em Sambrook, 2001 (J *et al.*, 2001).

[023] As bactérias transformadas foram espalhadas em placas de ágar Luria-Bertani contendo ampicilina (0,05 g/L), IPTG (0,5 mM) e fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (80 µg/mL). O fosfato no meio inibe a expressão do gene da fosfatase alcalina endógena bacteriana, e IPTG induz o promotor lac permitindo a expressão de proteínas de fusão (fosfatase alcalina) que hidrolisam o fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolile fazem com que as colônias bacterianas fiquem azuis. Uma colônia azul resistente a ampicilina foi selecionada e cultivada em meio 2 X extrato de levedura e triptona (2XTY) com ampicilina (0,05 g/L) a 37 °C até atingir leitura entre 0,6-1,0 (A_{600nm}). O promotor foi, em seguida, induzido com IPTG (0,8 mM) durante a noite. As bactérias de culturas foram centrifugadas, e o sobrenadante foi separado do sedimento. O pelet foi ressuspendido em solução de sacarose (20% de sacarose, 0,3 mol/L Tris-HCl, pH 8,0, ácido 1mmol/L EDTA) e proteínas periplasmáticas foram obtidas

por choque osmótico a frio. A suspensão foi centrifugada durante 10 min a 10.000 xg a 4°C, e o sobrenadante contendo a proteína recombinante solúvel foi recolhido. A proteína foi detectada por ambos SDS-PAGE e Western Blotting com anticorpos policlonais de coelho anti fosfatase alcalina. Amostras de proteína recombinante foram extensivamente dialisadas contra tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4.

Expressão e identificação da proteína recombinante scFv-LimAb7/fosfatase alcalina

[024] A expressão da proteína recombinante foi analisada após a electroforese em 10% SDS-PAGE seguido por coloração com Coomassie Brilliant Blue ou transferência passiva durante a noite para uma membrana de nitrocelulose 0,45 milímetros. Após o bloqueio da membrana com 5% de leite em pó desnatado em PBS, as proteínas recombinantes com atividade de fosfatase alcalina foram detectadas por incubação com substrato de fosfatase alcalina BCIP/NBT (Sigma-Aldrich). A atividade de fosfatase alcalina dos extratos periplasmáticos foi medida em automático Beckman Coulter DxC800 utilizando procedimentos padrão.

Ensaio de especificidade da proteína recombinante LimAb7/fosfatase alcalina

[025] Venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* foram coletados por estimulação elétrica aplicada ao cefalotórax. Subsequentemente, os venenos foram filtrados, secos sob vácuo e armazenados a -20 °C. A proteína recombinante dermonecrótica (rLiD1) foi produzida como descrito anteriormente (Felicori *et al.*, 2006). A concentração total de proteína foi avaliada por um ensaio de ácido bicinconínico (Pierce). Anticorpos de cavalo policlonal específico para *L. intermedia* foram purificados num único passo por cromatografia de imunoafinidade utilizando veneno de *L. intermedia* imobilizado na coluna CNBr-Sepharose (GE-Healthcare) tal como anteriormente relatado (Chávez-Olórtegui *et al.*, 1994; Alvarenga *et al.*, 2003).

[026] Os venenos e a proteína recombinante rLiD1 foram submetidos a um gel SDS-PAGE 12,5%. Os géis foram corridos a 120 V durante 1 h. Após a eletroforese, as proteínas dos géis foram coradas com azul brilhante de Coomassie para a identificação de bandas de proteínas, ou transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 milímetros. Os locais de ligação não específicos foram bloqueados durante 1 h em PBS contendo 5% leite em pó desnatado e 0,3% (v/v) de Tween 20. Em seguida, a membrana foi incubada com o scFv-FA diluído 1: 2 em PBS-T (PBS, contendo 0,05% (v/v) de Tween 20) durante 1 h à temperatura ambiente. A atividade FA foi detectada por incubação com substrato BCIP / NBT (Sigma-Aldrich). Como controle, LiMab7 (molécula inteira) purificado foi usado no lugar da proteína recombinante e os imunocomplexos foram revelados como anteriormente relatado (Alvarenga *et al.*, 2003).

Pesquisa de análise de sequência em bancos de dados

[027] Para comparar as sequências da região V (variável) de imunoglobulinas foi utilizado o ImMunoGenetics (IMGT), numeração única, e padrões aprovados pela Organização Mundial de Saúde (OMS)/União Internacional de Sociedades de Imunologia (IUIS). Para tanto foram utilizadas as ferramentas de interfaces Web IMGT (IMGT / V-QUEST) e bases de dados (IMGT / LIGM-DB e IMDT / 3D estrutura-DB) (Lefranc *et al.*, 2015).

Protocolo de Elisa por competição

[028] A proteína recombinante rLiD1 (100 µL, 5 µg./mL) foi imobilizada em placas de 96 poços (ImmunoNunc, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) por incubação durante 16 h a 4 °C. A placa foi bloqueada com 2% de caseína diluída em PBS por 60 min a 20 °C. As placas foram então incubadas com soro humano diluído a 1:2 em presença de veneno de *L. intermedia* em várias concentrações (0.039 a 10 µg/mL) a 37 °C durante 1 hora. Depois disso, extratos periplasmático contendo o scFv-LiMab7/FA diluído 1: 6 (100 µL) foram incubados por 1h a 37 °C. A solução de substrato de FA, fosfato de 4-metil (4-

MUP, Sigma), foi adicionada antes de se medir a fluorescência com excitação a 360 nm e emissão a 440 nm utilizando um leitor de placas de fluorescência (Infineto 200 PROTECAN). Todas as amostras foram medidas em triplicata. Três lavagens com PBS (pH 7,4) contendo 0,1% de Tween 20 foram realizadas entre cada um dos passos. O extrato periplasmático bacteriano com uma proteína recombinante scFv / FA irrelevante foi usada em vez de scFv-LiMab7 / FA como controle.

ELISA em formato sanduíche

[029] Placas de 96 poços (Immunonunc, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL.) foram sensibilizadas durante a noite com 100 µl/mL de uma solução de 10 µg de IgG F(ab)₂ de cavalo anti *L. intermedia* em tampão carbonato pH 9,6. Após o bloqueio (2% de caseína em PBS) 100 µl de soro humano diluído 1:2 contendo o veneno de *L. intermedia* em várias concentrações (0.039 a 20 µg/mL) foram adicionados e incubados por 1 h a 37 °C) e testados. As placas foram incubadas com extrato periplasmático bacterianos contendo scFv-LiMab7 / FA diluído 1: 6 (100 µL) durante 1 h a 37 °C. Uma solução de substrato de FA, fosfato de 4-metil (4-MUP, Sigma), foi adicionada antes de se medir a fluorescência com excitação a 360 nm e emissão a 440 nm utilizando um leitor de placas de fluorescência (Infineto 200 PROTECAN). Todas as amostras foram medidas em triplicata. Três lavagens com PBS (pH 7,4) contendo 0,1% de Tween 20 foram realizadas entre cada um dos passos intermediários. Um extrato periplasmático contendo uma proteína recombinante scFv/FA irrelevante foi usado em vez de scFv-LiMab7/FA como controle.

Legendas das Figuras:

[030] **Figura 1.** Sequências nucleotídicas (A) e aminoacídicas (B) das cadeias pesada e leve do scFv LimAb7. As sequências correspondentes ao peptídeo juncional estão sublinhadas, enquanto que as sequências correspondentes às

regiões determinantes de complementariedade (CDR) das cadeias pesada (VH) e leve (VL) estão indicadas em cinza e acima dos aminoácidos componentes de cada região.

[031] **Figura 2.** Modelagem do scFv LiMab7 e construção do imunoc conjugado colorimétrico. A) Modelagem *in silico* do scFv LiMab7. B) Clonagem do gene que codifica scFv-LiMab7 no vetor pLip6/GN. C) Representação esquemática da proteína recombinante scFv-LiMab7 com a proteína de fusão fosfatase alcalina (FA) resultando scFv-LiMab7/FA.

[032] **Figura 3.** Expressão da proteína recombinante scFv-LiMab7/FA em periplasma de bactérias recombinantes. O gel SDS-PAGE foi analisado após coloração com azul de Coomassie (A) ou após a sua transferência para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada e, em seguida, incubada com substrato de AP (B). (M) marcador de massa molecular; (1) periplasma das bactérias transformadas com plasmídeo vazio; (2) periplasma das bactérias transformadas com pLip6 / GN LiMab7 expressando a proteína recombinante scFv-LiMab7 / FA

[033] **Figura 4.** Análise funcional da proteína recombinante scFv-LiMab7/FA. A) Gel SDS-PAGE de venenos após coloração com Coomassie (esquerda) ou transferidos para membrana de nitrocelulose a qual foi incubada com a proteína recombinante scFv-LiMab7/FA (direita). M: marcador de massa molecular; (1) *L. laeta*; (2) *L. gaucho*; (3) *L. intermedia*; (4) toxina recombinante rLiD1. (+) Análise da transferência de proteínas por Western blotting utilizando o IgG LiMab7 (molécula inteira original) como anticorpo primário. B) ELISA por competição. Princípio do ensaio e análise de competição entre o veneno de *L. intermedia* diluído em soro humano e a toxina recombinante rLiD1 em relação à proteína recombinante scFv-LiMab7/FA. Os resultados foram expressos levando em consideração a diminuição de unidades de fluorescência (UF) com o aumento da concentração de veneno. C) ELISA sanduíche. Princípio do ensaio: Veneno de *L. intermedia* diluído em soro humano capturado pela

imunoglobulina de cavalo IgG F(ab')₂ anti veneno de *L. intermedia* cuja detecção foi realizada utilizando proteína recombinante scFv-LiMab7/FA. Os resultados foram expressos por um aumento de unidades de fluorescência (UF) com o aumento da concentração de veneno.

[034] Referências

ALVARENGA, L. M. et al. 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, n. 7, p. 725-31, Dec 2003. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757202> >.

_____. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. **Toxins (Basel)**, v. 6, n. 8, p. 2541-67, Aug 2014. ISSN 2072-6651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25153256> >.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. et al. ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 32, n. 12, p. 1649-56, Dec 1994. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7725332> >.

FELICORI, L. et al. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 509-19, Oct 2006. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934304> >.

FIELDS, C. et al. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nat Protoc**, v. 8, n. 6, p. 1125-48, Jun 2013. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680984> >.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, v. 304, n. 4, p. 261-7, Oct 1992. ISSN 0002-9629. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1415323> >.

GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M. et al. *Loxosceles niedeguidonae* (Araneae, Sicariidae) a new species of brown spider from Brazilian semi-arid region. **Zookeys**, n. 175, p. 27-36, 2012. ISSN 1313-2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22451789> >.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med**, v. 44, n. 6, p. 608-24, Dec 2004. ISSN 1097-6760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573037> >.

J, S.; EF, F.; T, M. **Molecular Cloning. A laboratory manual**. 3rd. 2001.

JIACOMINI, I. et al. Immunodetection of the "brown" spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrototoxin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein. **Immunol Lett**, v. 173, p. 1-6, Mar 2016. ISSN 1879-0542. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26970375> >.

LEFRANC, M. P. et al. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D413-22, Jan 2015. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378316> >.

MALIQUE, C. M. et al. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 664-71, Dec 2011. ISSN 1879-3150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21986355> >.

N, P. **The World Spider Catalog, version 13.5**. American Museum of Natural History 2013.

SILVESTRE, F. G. et al. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 927-936, Dec 2005. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234316200012 >.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clin Dermatol**, v. 24, n. 3, p. 213-21, 2006 May-Jun 2006. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16714202> >.

VETTER, R. S.; ISBISTER, G. K. Medical aspects of spider bites. **Annu Rev Entomol**, v. 53, p. 409-29, 2008. ISSN 0066-4170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17877450> >.

REIVINDICAÇÕES

1. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos caracterizado por ser um fragmento recombinante de anticorpo obtido a partir de um anticorpo monoclonal (LiMab7) produzido contra proteínas dermonecroticas, denominadas de esfingomielinases D (SMase D) ou fosfolipases D (PLD) do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, e compreende:

A) um domínio variável de cadeia pesada incluindo as regiões determinantes de complementariedade ou CDR (do inglês "complementarity determining regions") 1, 2 e 3 (CDR1, CDR2 e CDR3) constituídas pelas sequências de aminoácidos SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 e SEQ ID N° 4, respectivamente;

B) um domínio variável de cadeia leve incluindo as regiões determinantes de complementariedade CDR1, CDR2 e CDR3 constituídas pelas sequências SEQ ID N°: 5, SEQ ID N° 6 e SEQ ID N° 7, respectivamente;

C) um peptídeo juncional ou espaçador entre os domínios (SEQ ID N° 8).

2. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser uma molécula ligante da proteína dermonecrotica (SMase D ou PL D) que compreende a um imunocombinado contendo uma etiqueta de fosfatase alcalina localizada na porção C-terminal, e opcionalmente um peptídeo como espaçador.

3. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser um anticorpo ou um fragmento de anticorpo (SEQ ID N° 9).

4. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por compreender uma sequência de 264 aminoácidos componentes das regiões de CDR tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID N° 1, na qual os aminoácidos 26 ao 34, do 51 ao 58, do 97 to 111, do 165 ao 176, do 194 ao 196 e do 233 ao 243 são peptídeos constituídos por aminoácidos correspondentes às sequências SEQ ID N° 2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4, SEQ ID N°5, SEQ ID N°6, e SEQ ID N°7, respectivamente.

5. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de acordo com as reivindicações 1 e 3, caracterizado por compreender uma sequência nucleotídica (SEQ ID N° 17) que codifica uma molécula correspondente a um fragmento de anticorpo, ou que faça parte de um imunocjugado de acordo com a reivindicação 2.

6. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por compreender uma proteína recombinante composta pela sequência de aminoácidos SEQ ID N° 9 que reconhece proteínas dermonecroticas SMase D ou PLD.

7. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de acordo com as reivindicações 1 a 6, a, caracterizado por a proteína recombinante ter atividade neutralizante do veneno de aranhas do gênero Loxosceles, preferencialmente o da aranha Loxosceles intermedia.

8. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de

acordo com a reivindicação 5, caracterizado por ser produzido após inserção em um vetor de expressão e ou em uma célula hospedeira.

9. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter uma sequência aminoacídica que compreende o domínio VH onde estão inseridas as sequências CDR 1, CDR 2 e CDR 3 como mostrado na SEQ ID No 2, 3 e 4, respectivamente.

10. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter uma sequência nucleotídica que codifica o domínio VH onde estão inseridas as sequências CDR 1, CDR 2 e CDR 3 como mostrado na SEQ ID No 10, 11 e 12, respectivamente.

11. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por conter uma sequência aminoacídica que compreende o domínio VL onde estão inseridas as sequências CDR 1, CDR 2 e CDR 3 como mostrado na SEQ ID No 5, 6 e 7, respectivamente.

12. Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por conter uma sequência nucleotídica que codifica o domínio VL onde estão inseridas as sequências CDR 1, CDR 2 e CDR 3 como mostrado na SEQ ID No 13, 14 e 15, respectivamente.

13. **Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um insumo de ensaio diagnóstico para detecção de SMase D ou PLD.

14. **Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser componente de medicamento.

15. **Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por estar presente em composição farmacêutica compreendendo a proteína recombinante que reconhece SMase D ou PL D e um veículo farmacêuticamente aceitável.

16. **Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um insumo para uso em método de diagnóstico para acidentes por animais peçonhentos como os aracnídeos do gênero *Loxosceles*.

DESENHOS

Figura 1

A

>caggtccagctgcagcagtcaggtccggaactggtgaaaccgggt
 gcgagcgtcaaaatctcttgtaaagcgagtggttatgccttctct **CDR1-VH**
 tcgagttggatgaactgggtgaaacagcgtccggggccaaagtctg
 gaatggattggtcgcatctaccgggcgatggtgacacdaactat **CDR2-VH**
 aatggtaaatttaagggcaaagcaaccctgacggctgataagagc
 tctagtagcgcatacatgcagctgtcctcactgacgtctgtcgac
 agtgcagtgatatttttgcgctctgtggacgtacggttacagcaag **CDR3-VH**
 tac tactacttc gat gactggggc cag ggt acc act ctc acc gtt
 agcagcggcggcggtggcggatccggcggaggcggtagcggcggt
 ggcgatcc gat attgtcatg acc cag tccccgtctagtctggcg
 gtt acc gccggcgaaaagggtc act atgcgctgtaaatectca **CDR1-VL**
 agtctgctgtggaacggttaatgaaaacaat tacctgtcttgg tat **CDR1-VL**
 cag caaaag cag ggtcaaccgccaaaactgctgatttatggcgcc
 tccatccgtgaatcatgggttccg gat cgcttt acc ggctcgggt
 agcggc acc gacttcaacctgacgatcagcaatggt cat gcgaa **CDR3-VL**
 gat ctggccggt tac tattgcag cacaat cat ggctcattcctg
 ccg tac acgttcggtggtggcacgaaactggaaatcaaggcggcc
 gcactc gag caccaccaccaccactga (SEQ ID N°9)

B

Q V Q L Q Q S G P E¹⁰ L V K P G A S V K I²⁰ S C K A S G Y A F S³⁰ **CDR1-VH**
 S S W M N W V K Q R⁴⁰ P G Q G L E W I G R⁵⁰ I Y P G D G D T N Y⁶⁰ **CDR2-VH**
 N G K F K G K A T L⁷⁰ T A D K S S S T A Y⁸⁰ M Q L S S L T S V D⁹⁰
 S A V Y F C A R W T¹⁰⁰ Y G Y S K Y Y Y F D¹¹⁰ D W G Q G T T L T V¹²⁰ **CDR3-VH**
 S S G G G G S G G¹³⁰ G G S G G G S D I¹⁴⁰ V M T Q S P S S L A¹⁵⁰ **Peptídeo juncional "linker"**
 V T A G E K V T M R¹⁶⁰ K S S Q S L L W N¹⁷⁰ V N E N N Y L S W Y¹⁸⁰ **CDR1-VL**
 Q Q K Q G Q P P K L¹⁹⁰ L I Y G A S I R E S²⁰⁰ W V P D R F T G S G²¹⁰ **CDR2-VL**
 S G T D F N L T I S²²⁰ N V H A E D L A V Y²³⁰ Y C Q H N H G S F L²⁴⁰ **CDR3-VL**
 P Y T F G G T K L²⁵⁰ E I K A A A L E H H²⁶⁰ H H H H * (SEQ ID N° 1)

Figura 2

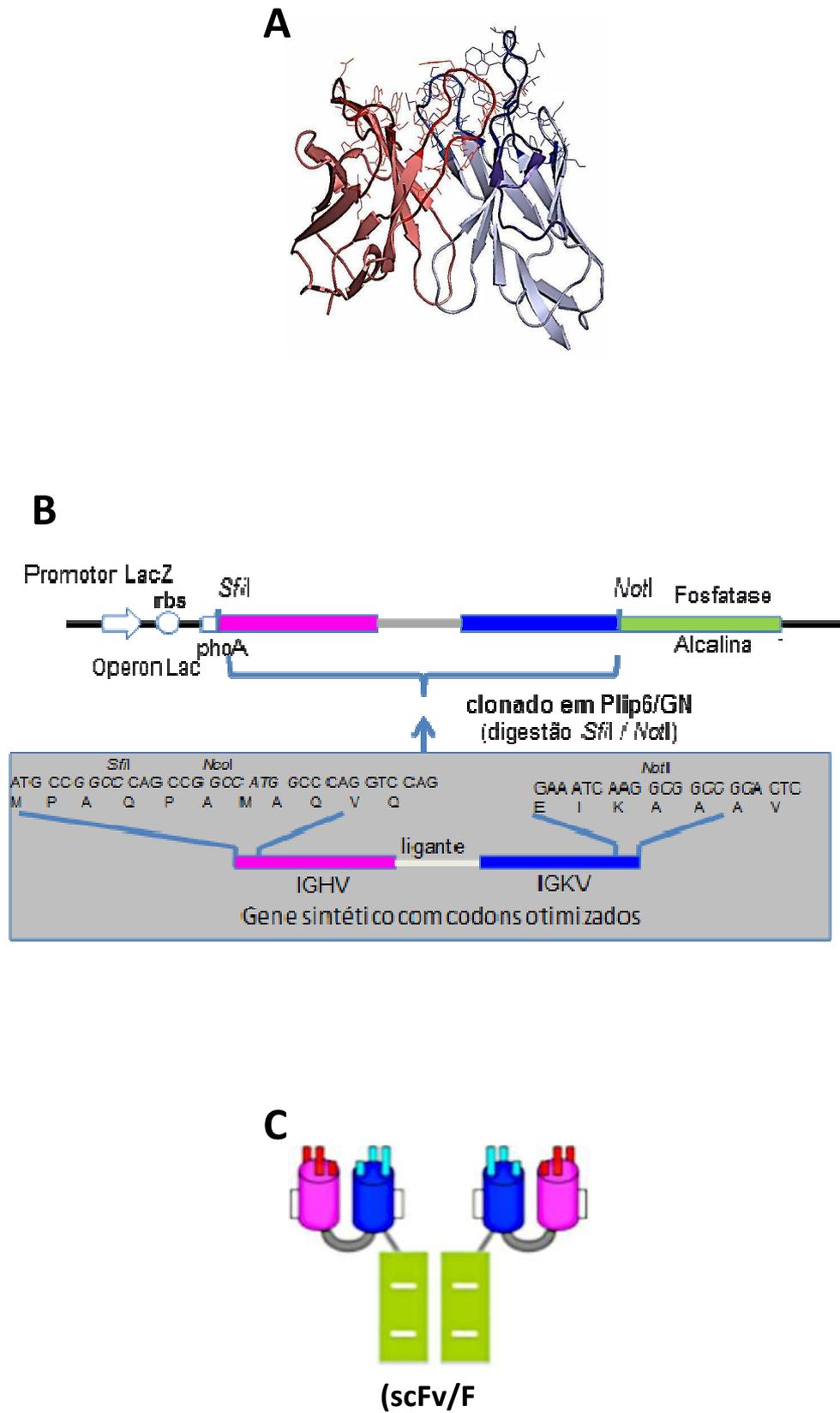


Figura 3

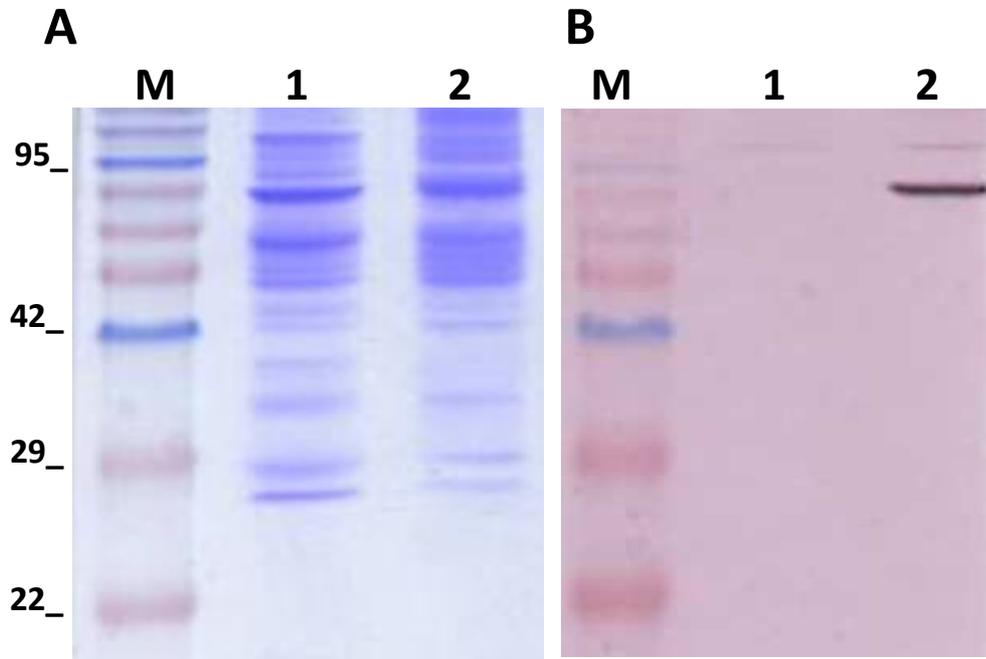
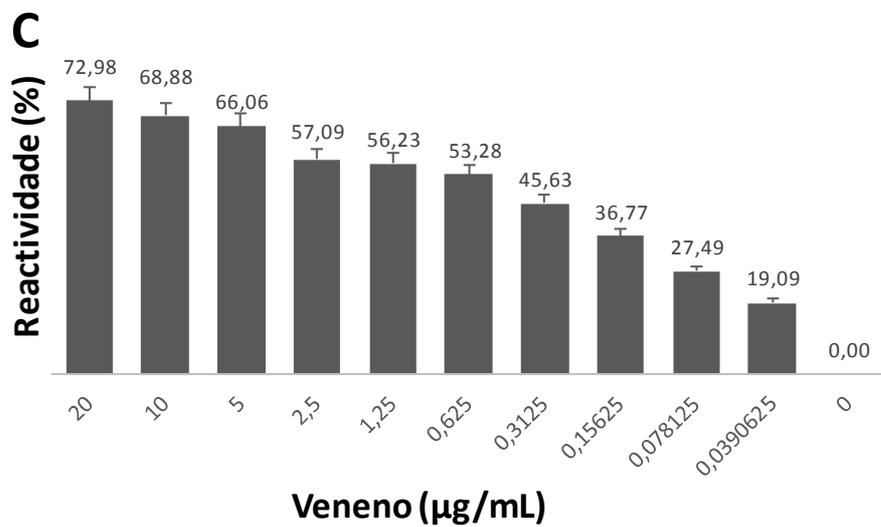
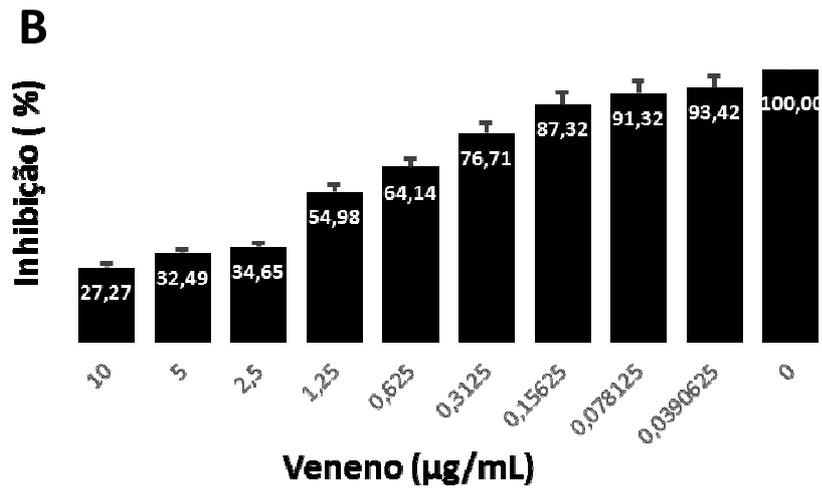
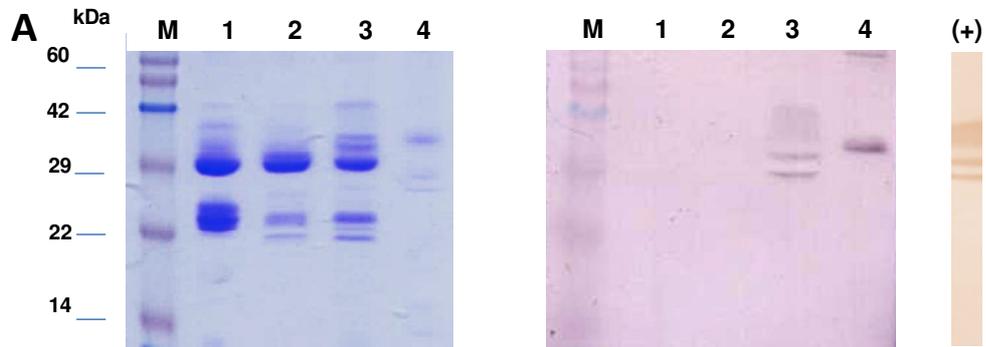


Figura 4



RESUMO**Fragmento variável de cadeia simples (ScFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico detecta veneno em fluidos biológicos**

Fragmento variável de cadeia simples (scFv) de anticorpo fusionado à agente colorimétrico capaz de detectar veneno de animal peçonhento em fluidos biológicos foi obtido a partir da clonagem e expressão do gene referente à fosfatase alcalina bacteriana a um anticorpo monoclonal, denominado de LimAb7, capaz de reconhecer e neutralizar componentes do veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia*. Como produto obteve-se uma proteína bifuncional colorimétrica que consiste no fragmento de anticorpo de cadeia simples (scFv) do LimAb7 fusionado à fosfatase alcalina (scFv LiMab7/FA). Por ELISA, scFv LiMab7/FA provou-se ser eficiente na detecção rápida e específica da peçonha em concentrações que variam de 39 a 20.000 ng/mL com um limite de detecção de 39 ng/mL sem haver reação cruzada com outros venenos testados.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência_formato txt.txt
- Data de Geração do Código: 25/09/2019
- Hora de Geração do Código: 11:15:55
- Código de Controle:
 - Campo 1: 8858A9074DCCD61F
 - Campo 2: D13AB917CCD04125