



## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 025638 9

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 48031918000124

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua Quirino de Andrade, 215

**Cidade:** São Paulo

**Estado:** SP

**CEP:** 01049-010

**País:** Brasil

**Telefone:** 11 56270217

**Fax:** 11 56270103

**Email:** auin@unesp.br

## Dados do Pedido

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** ANTICORPO MONOCLONAL, IMUNOSSENSOR E USO DO MESMO

**Resumo:** A presente invenção refere-se a um imunossensor para a detecção de sangue oculto em fezes, o qual utiliza um anticorpo monoclonal dirigido contra antígenos de alta frequência expresso em hemácias humanas, mais especificamente, anticorpo monoclonal murino antiglicoforina A. A detecção precoce de sangue oculto em fezes permite o diagnóstico de pequenos sangramentos no trato digestivo, bem como úlceras, colite ou, até mesmo, câncer de cólon, dentre outras.

**Figura a publicar:** 1

## Dados do Procurador

---

### Procurador:

**Nome ou Razão Social:** Renan Padron Almeida

**Numero OAB:**

**Numero API:**

**CPF/CNPJ:** 33778301896

**Endereço:** Rua Joaquim Antunes 819

**Cidade:** São Paulo

**Estado:** SP

**CEP:** 05415012

**Telefone:** 1156270570

**Fax:**

**Email:** renan.padron@unesp.br

## Dados do Inventor (72)

---

### Inventor 1 de 11

**Nome:** PÂMELA FERNANDA MARTINEZ

**CPF:** 40053088808

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** Rua Treze de Maio

**Cidade:** Bauru

**Estado:** SP

**CEP:** 17016-170

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

### Inventor 2 de 11

**Nome:** ELENICE DEFFUNE

**CPF:** 20104537949

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Médico

**Endereço:** Rua Castro Alves, 377

**Cidade:** Botucatu

**Estado:** SP

**CEP:** 18608-550

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

### Inventor 3 de 11

**Nome:** ANA LÍVIA DE CARVALHO BOVOLATO

**CPF:** 33755427800

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação

**Endereço:** Av. Dr. Montenegro, s/n

**Cidade:** Botucatu

**Estado:** SP

**CEP:** 18618-687

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

**Inventor 4 de 11**

**Nome:** RAFAEL FACTOR CARANDINA

**CPF:** 36670213808

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação

**Endereço:** Rua das Acácias, 58

**Cidade:** Pirassununga

**Estado:** SP

**CEP:** 13631-130

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

**Inventor 5 de 11**

**Nome:** MARTIN KÁSSIO LEME DA SILVA

**CPF:** 40467625867

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outros trabalhadores de serviços diversos

**Endereço:** Rua Silvestre Bartoli, 843

**Cidade:** Botucatu

**Estado:** SP

**CEP:** 18608-013

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

**Inventor 6 de 11**

**Nome:** JOÃO PEDRO HÜBBE PFEIFER

**CPF:** 00824444043

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista

**Endereço:** Rua Salim Kahil, 501 apto 33

**Cidade:** Botucatu

**Estado:** SP

**CEP:** 18606-802

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

**Inventor 7 de 11**

**Nome:** IVANA CESARINO

**CPF:** 21843200805

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Azaléia, 730

**Cidade:** Botucatu

**Estado:** SP

**CEP:** 18603-550

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

**Inventor 8 de 11**

**Nome:** ANA LIZ GARCIA ALVES

**CPF:** 14121946871

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** ALAMEDA AQUARIUS 1089

**Cidade:** Botucatu

**Estado:** SP

**CEP:** 18607-180

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

**Inventor 9 de 11**

**Nome:** MÁRJORIE DE ASSIS GOLIM

**CPF:** 28619073800

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** Rua Abílio Dorini, 938

**Cidade:** Botucatu

**Estado:** SP

**CEP:** 18610-018

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

**Inventor 10 de 11**

**Nome:** WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI

**CPF:** 29375147827

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua FRANCISCO CARICATTI - 1007

**Cidade:** Botucatu

**Estado:** SP

**CEP:** 18603-100

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

**Inventor 11 de 11**

**Nome:** ANDREI MOROZ

**CPF:** 31102750824

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Av. Pio Correa Pinheiro, 651, Apto 104A

**Cidade:** Araraquara

**Estado:** SP

**CEP:** 14807-031

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:**

#### Documentos anexados

---

<b>Tipo Anexo</b>	<b>Nome</b>
Procuração	Proc e Posse 07-2018.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante GRU 3 428597.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	Quadro Reivindicatório.pdf
Desenho	Figuras.pdf
Resumo	Resumo.pdf

#### Acesso ao Patrimônio Genético

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

#### Declaração de veracidade

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.



## PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento,

a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua,

nomeia e constitui seu procurador, **RENAN PADRON ALMEIDA**, brasileiro, portador do RG nº 43.746.608-5, SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 337.783.018/96,

outorgando-lhe poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI e outras instituições competentes, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de

invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópias, termos de cessão de direitos, termos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade intelectual, incluindo, mas não se limitando, aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou de licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado

Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP. 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: [auin@unesp.br](mailto:auin@unesp.br)

todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

São Paulo, 16 de julho de 2018.



*Srg Roberto Nobre*

UNESP

*pl* Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Reitor

SERGIO ROBERTO NOBRE  
VICE-REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA



Reconheço a 1 firma com valor econômico por semelhança de SERGIO ROBERTO NOBRE, do que dou fé.

Em tesº da verdade. ANDREI BARRETO DA SILVA -  
São Paulo/Capital, 24 de julho de 2018. Valor recebido R\$ 9,25  
\*Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba\*



# Termo de Posse e Compromisso do Professor Doutor Sandro Roberto Valentini como Reitor da UNESP

Nos dezesseis dias do mês de janeiro de dois mil e dezessete, às catorze horas e trinta minutos, no Teatro Santander, São Paulo, em sessão pública e solene do Conselho Universitário, o Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, por este ato, toma posse na função de Reitor da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com mandato de quatro anos, a contar de 15 de janeiro de 2017, conforme Decreto de nomeação de 28.11.2016, do excelentíssimo senhor Geraldo Alckmin, Governador do Estado de São Paulo, publicado no Diário Oficial do Estado de 29 de novembro de 2016 e retificado conforme publicação de 22 de dezembro de 2016. Na oportunidade, o empossado assume o compromisso de cumprir e fazer cumprir o Estatuto, o Regimento Geral e a legislação da UNESP, bem como as leis maiores do ensino no país. Para constar, foi elaborado o presente termo, assinado pelo Professor Doutor Julio Cezar Durigan, magnífico Reitor da UNESP, e pelo Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, ora empossado, São Paulo, 16 de janeiro de 2017.

*[Handwritten signatures and scribbles]*

9.º TFE  
9.º TFE  
9.º TFE

**9.º TABELIÃO DE NOTAS**  
Rua Marconi, 124 - 1.º no 6.º andar - CEP 01047-000 - São Paulo  
Telefone: (11) 3259-2611 - Fax: (11) 2174-6858  
www.nonoartorio.com.br

Reconheço as 3 firmas sem valor econômico por semelhança de JULIO CEZAR DURIGAN, SANDRO ROBERTO VALENTINI, MARIA DALVA SILVA PAGOTTO. do que dou fé.

Em tes. da verdade. GUSTAVO FONTANA ANDOLPHO - São Paulo/Capital, 16 de janeiro de 2017. Valor recebido R\$ 17,10  
"Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba"

**COLEGIO NOTARIAL DO BRASIL**  
113787  
FIRMA 2  
1020AA0191660

**COLEGIO NOTARIAL DO BRASIL**  
113787  
FIRMA 1  
1020AA0622948

S. Paulo, 06 MAR 2017

**COLEGIO NOTARIAL DO BRASIL**  
113787  
AUTENTICACAO  
1020A20395514





No. compromisso banco 1032661000100003	No. compromisso cliente 428597/DS1 101009853	Data do Crédito 29/11/2019	Valor 70,00
---	---	-------------------------------	----------------

Convênio 0033-0239-004900019792	Data da Solicitação 29/11/2019	Agência/Conta Corrente 0239 / 000430023105
------------------------------------	-----------------------------------	---

Nome/Razão Social do Pagador Original UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE	CPF/CNPJ do Pagador Original 48.031.918/0001-24
--	--

Nome/Razão Social do Beneficiário Original INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST	CPF/CNPJ do Beneficiário Original 42.521.088/0001-37
--	---

Nome/Razão Social do Pagador Efetivo FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENT	CPF/CNPJ do Pagador Efetivo 57.394.652/0001-75
--	---

Instituição Financeira Favorecida  
001 - BANCO DO BRASIL S.A.

Código de Barras  
00190.00009 02940.916196 12428.597178 4 80990000007000

Valor Nominal 70,00	Desc. / Abat. 0,00	Juros 0,00	Valor a Pagar 70,00
------------------------	-----------------------	---------------	------------------------

Tipo de Serviço  
Pagamento Fornecedor

Complemento do Tipo de Serviço

Autenticação Bancária  
11CBC4E1C4FD5FD3A732F20

**Central de Atendimento Santander Empresarial**

4004-2125 (Regiões Metropolitanas)  
0800 726 2125 (Demais Localidades)  
0800 723 5007 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

**SAC** - Atendimento 24h por dia, todos os dias.

0800 762 7777  
0800 771 0401 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

**Ouvidoria** - Das 9h às 18h, de segunda a sexta-feira, exceto feriado.

0800 726 0322  
0800 771 0301 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

**ANTICORPO MONOCLONAL, IMUNOSSENSOR E USO DO MESMO****CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção se insere no campo da ciência médica, mais especificamente no que se refere a área de análise de materiais biológicos e diagnósticos, e descreve um imunossensor para a detecção de sangue oculto em fezes, o qual utiliza um anticorpo monoclonal dirigido contra antígenos de alta frequência expresso em hemácias humanas, mais especificamente, anticorpo monoclonal murino anti-glicoforina-A.

[002] A invenção ainda prevê um imunossensor que realiza o teste ora descrito e permite investigar doenças como a anemia ferropriva e lesões malignas ou precursoras de neoplasias do cólon e do reto.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[003] A pesquisa por sangue oculto em fezes é um exame laboratorial que tem por objetivo identificar a presença de sangue em pequenas quantidades, invisíveis a olho nu, nas fezes. É um teste simples, não invasivo, de baixo custo e que tem se mostrado muito eficaz.

[004] O exame é capaz de detectar frações muito pequenas de sangue nas fezes, auxiliando no diagnóstico precoce de pequenos pólipos adenomatosos (lesões precursoras da grande maioria dos cânceres colorretais, que são assintomáticas). No entanto, embora indique a presença de sangue, o teste não determina a causa ou local do sangramento.

[005] Para a análise, as fezes são coletadas e avaliadas por diferentes métodos clássicos, como o método do guáiacó e métodos imunoquímicos baseados na presença da



hemoglobina. No entanto, fatores como sangramento de gengiva, sangramento nasal, período menstrual, ingestão de alimentos coloridos e de carne malpassada, bem como alguns medicamentos, podem alterar o resultado dos testes.

[006] Dessa forma, a presente invenção provê um método rápido e seguro, um imunossensor e um kit para a detecção de sangue em fezes, o qual utiliza um anticorpo monoclonal dirigido contra os antígenos presentes na membrana das hemácias (antígenos estruturais de alta frequência).

#### **ESTADO DA TÉCNICA**

[007] Alguns documentos do estado da técnica descrevem testes rápidos para detectar sangue oculto nas fezes.

[008] O documento US 5068197A descreve um método no qual as fezes são colocadas em contato com um cromógeno e um hidroperóxido na presença de um derivado de quinolina. Neste teste, a interferência da carne ingerida é substancialmente eliminada. Além disso, tal documento reivindica um sistema de coleta de amostras seriadas de fezes, com 3 segmentos separados e que devem ser fechados após a colocação de cada amostra. Trata-se de um princípio de formulação de teste completamente diferente da que está sendo proposto na presente invenção. Apesar dos autores informarem a diminuição da interferência da carne ingerida, o método utilizando hidroperóxido reage com qualquer composto heme, o que leva a reação falso positiva.

[009] No documento US4818702 são descritos testes para detectar sangue oculto nas fezes os quais utilizam um sistema de solventes e um multicromógeno compreendendo

guáiaco e ABTS. Nestes testes, objetiva-se reduzir a incidência de falsos negativo e positivo. Adicionalmente, no referido documento há a seguinte afirmação: "*In a typical guaiac test, a blue color denotes a positive test result*", isto é, em um típico teste guáiaco, uma cor azul significa um resultado de teste positivo. Assim, apesar de técnicas para minimizar as reações falso positivas, sua leitura é baseada na cor, muito diferente da proposta na presente invenção, que é por reconhecimento específico de marcador na superfície das hemácias ou em fragmentos de membrana de hemácias (método imunológico).

[010] No documento de anterioridade US5391498, faz-se referência a um teste que utiliza uma matriz impregnada com guáiaco para detectar sangue oculto nas fezes. Em US4493892, trata-se da miniaturização do teste clássico com todos os inconvenientes de seu antecessor. Sofre interferência dos alimentos, requer dieta rigorosa, além de não ser específico.

[011] O US5196167 refere-se a uma folha de teste para determinar a presença de sangue oculto nas fezes, em que a área de teste compreende uma tinta contendo uma substância doadora de oxigênio e um cromógeno. Tal método, assim como os demais, apesar de representarem um avanço na realização de uma técnica fastidiosa, apresenta os mesmos inconvenientes. O teste imunoquímico descrito anteriormente usa anticorpo contra a hemoglobina livre. É importante destacar que a hemoglobina é uma proteína altamente representada em muitos fluidos. A efetiva comprovação da hemorragia está na detecção de antígenos membranários e não do conteúdo das hemácias.

[012] O documento US7288413B2 descreve um teste imunológico para determinar se a hemoglobina está presente em uma amostra fecal, o qual utiliza anticorpos monoclonais direcionados para epítomos da hemoglobina e, dessa forma, garantindo a não necessidade de dieta prévia. Entretanto, diferentemente da presente invenção, este teste pode oferecer reação com hemoglobinas de animais de outras espécies, dessa forma, possibilitando resultados falso positivos.

[013] Ainda, o método da presente invenção não interage com hemácias suínas, bovinas e de coelhos. Quanto às aves, embora testes não tenham sido realizados, a probabilidade de reação cruzada é quase nula, uma vez que as hemácias das aves são nucleadas (e as hemácias de mamíferos não o são).

[014] Diferentemente, a presente invenção fornece um método para a detecção de sangue oculto em fezes. O referido método, de leitura rápida, precisa e objetiva, utiliza anticorpo monoclonal murino anti-glicoforina A. Ainda é objeto desta invenção um imunossensor compreendendo o referido anticorpo monoclonal.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

[015] A presente invenção tem por objetivo propor um imunossensor para a detecção de sangue oculto em fezes, o qual utiliza um anticorpo monoclonal dirigido contra antígenos de alta frequência expresso em hemácias humanas, a saber, anticorpo monoclonal murino anti-glicoforina-A.

[016] A detecção precoce de sangue oculto em fezes permite o diagnóstico de pequenos sangramentos no trato digestivo, bem como úlceras, colite ou, até mesmo, câncer de

cólon, dentre outras.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[017] Para obter uma visualização total e completa do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue.

[018] A FIG. 1 mostra a caracterização imunológica do anticorpo monoclonal murino anti-glicoforina-A da presente invenção e dos padrões comerciais CD235a e CD236BD pela técnica de *western blotting* (respectivamente, o anticorpo monoclonal anti-glicoforina A comercialmente disponível e a glicoforina C).

[019] A FIG. 2 mostra o *western blotting* do anticorpo anti-glicoforina A *versus* extratos membranário de hemácias de diferentes espécies.

[020] A FIG. 3 representa graficamente os voltamogramas cíclicos para o biossensor anti-glicoforina A em solução PBS, pH7,0, na presença de amostras de hemácias de boi, cão e humanas lisadas além de hemácias e leucócitos íntegros humanos. A positividade é evidenciada na presença de hemácias íntegras e lisadas de amostras humanas. Observa-se que a leitura em 5 minutos é suficiente para identificação do pulso positivo para hemácias humanas, mas não para bovinas. Logo, leitura em 5 minutos é precisa e foi confirmada em 3 métodos de leitura (potenciometria, amperometria e voltametria cíclica).

[021] A FIG. 4 representa graficamente o teste DPG realizado com hemácia humana e hemácia de boi, indicando a detecção de oxidação da hemácia humana a partir de 5 minutos.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[022] A presente invenção refere-se imunossensor

para a detecção de sangue oculto em fezes, o qual utiliza um anticorpo monoclonal dirigido contra antígenos de alta frequência expresso em hemácias humanas, a saber, anticorpo monoclonal murino anti-glicoforina A.

[023] Inicialmente é solicitado ao paciente a coleta de amostra de fezes, em recipiente próprio disponibilizado pelo laboratório, sem que a amostra tenha contato com vaso sanitário. Havendo dificuldade para a coleta indica-se o revestimento da parede do vaso sanitário com papel alumínio, para a coleta de parte da amostra de fezes com transferência da mesma com espátula, para o tubo coletor. O material de coleta da amostra é o padronizado e distribuído pelo laboratório.

[024] Acompanha o dispositivo um frasco com tampão PBS para a diluição da amostra de fezes a ser analisada, tornando-a uma suspensão. A composição do tampão é:

<b>Sal</b>	<b>Concentração (mmol/L)</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
NaCl	137	8.0
KCl	2.7	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10	1.44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8	0.24

[025] Após a homogeneização da amostra de fezes em tampão PBS, uma alíquota é retirada (100 µL) e depositada sobre o eletrodo.

[026] Ainda, a presente invenção diz respeito a um imunossensor, dirigido contra antígenos estruturais de alta frequência, que são expressos na membrana de hemácias humanas. Tal imunossensor, compreende o anticorpo monoclonal murino anti-glicoforina-A.

[027] O referido imunossensor é o dispositivo de

diagnóstico que pode ser na forma de bastão ou tarugo ou imunossensor impresso. Ele é destinado à identificação de hemácias (sangue) presente nas fezes de indivíduos que possam ser portadores de anemias crônicas, emagrecimentos de causa desconhecida, como *screening* inicial para investigação mais aprofundada. Em casos de positividade no teste, há indicação médica de exame de colonoscopia. Portanto, quando o serviço tiver padronizado o sensor impresso, será um método de *screening* para câncer colo retal, levando a um diagnóstico mais precoce.

[028] O reconhecimento de hemácias nas fezes é feito de forma imunológica, com a reação antígeno (hemácias) e anticorpo monoclonal murino antiglicoforina A desenvolvido para o teste. Este anticorpo foi acoplado no sensor, para posterior análise.

[029] A detecção precoce de sangue oculto em fezes permite o diagnóstico de pequenos sangramentos no trato digestivo, bem como úlceras, colite ou, até mesmo, câncer de cólon, dentre outras.

[030] Para tal, um anticorpo monoclonal murino anti-glicoforina-A, dirigido contra antígenos de alta frequência expressos em hemácias humanas, foi obtido. O referido anticorpo, denominado LAMB-8, foi testado com 15.612 hemácias e um resultado positivo foi obtido com todas elas.

[031] O anticorpo é um anticorpo da classe IgG e foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-sepharose, sendo imobilizado em uma suspensão de 0,3 mg de óxido de grafeno reduzido (rGO), ácido 1-pireno butírico e éster N-hidroxisuccinimida (pireno-NHS).

[032] A suspensão de óxido de grafeno reduzido (rGO) é obtida pela dispersão de óxido de grafeno em água (4 mg / mL), seguida da adição de uma solução etanólica de dodecilsulfato de sódio (8,0 mg em 15 mL de etanol grau analítico). Esta solução é sonicada durante 20 minutos em banho ultrassônico e adicionada, em seguida, de 16,0 mg de borohidreto de sódio, sendo sonicada por mais 20 minutos.

[033] Após a síntese, o rGO é centrifugado por 5 minutos com rotação de 6200 rpm e lavado de preferência três vezes com etanol até a solução tornar-se incolor. Por fim, 5 mL de etanol foi adicionado ao compósito resultante e o rGO foi seco à uma temperatura de 60 °C. Depois de seco, foi preparada uma suspensão de 0,025 mg de rGO e 1,0 mL de água ultrapura, a qual foi armazenada a de 2 a 6 °C, preferencialmente 4 °C.

[034] À suspensão de rGO previamente preparada, foi adicionada uma solução de pireno-NHS na concentração de 5mM, em uma proporção 1:1. A solução rGO / pireno-NHS foi armazenada sob refrigeração.

[035] Para o preparo do imunossensor, foram gotejados 10,0 µL da solução de rGO / pireno-NHS na superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GC) previamente polido e limpo em água ultrapura e etanol.

[036] O eletrodo GC/rGO/pireno-NHS foi seco em temperatura ambiente. Foram gotejados 20,0 µL da suspensão do anti-GPA (0,3 mg / mL) na superfície do eletrodo, o qual foi seco a temperatura ambiente.

#### TESTES REALIZADOS

[037] Para análise das amostras biológicas, foram gotejados, na superfície do imunossensor, 20,0 µL dos

respectivos analitos. Após 5 minutos de reação, foram realizados os experimentos de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.

[038] Ainda, foram realizadas análises do anticorpo pelo método de Citometria de Fluxo. A tabela 1 abaixo mostra a reatividade de 3 diferentes clones produzidos *in house*, e testados para identificar o que apresentava melhor desempenho para o imunossensor. Os testes foram comparados com 2 anticorpos comerciais (CD235a e CD236 da marca Biolegend).

Tabela 1 - Comparação da reatividade entre os clones produzidos e anticorpos comerciais

Suspensão de hemácias		CTRLE	LAMB-7	LAMB-8	LAMB-9	CD235a	CD236
Cão		-	-	+	+	-	W
Cavalo		-	+	+	+	-	W
Coelho		-	+	W	W	-	W
Porco		-	+	-	W	-	W
Boi		-	+	W	W	-	-
Rato		-	+	W	W	-	-
Humanas	O+	-	+	+	+	+	+
	NNSs	-	+	+	+	+	+
	MMSS	-	+	+	+	W	-
	MMsS	-	+	+	+	W	W
	MMSS	-	+	+	+	-	-
	MNSs	-	+	+	+	+	+
	NNSS	-	+	+	+	+	NR

- CTRLE = controle negativo;

- Lamb 7,8 e 9, diferentes clones secretores de anticorpos monoclonais anti-glicoforina A;



- CD235a = anti-glicoforina A comercial Biolegend®;
- CD236 anti-glicoforina C comercial Biolegend®

[039] Como pode ser observado, o anticorpo escolhido apresenta uma fraca reação de reconhecimento com coelho e boi, que representam tipos de carne que podem ser consumidas pelo ser humano. O fato do reconhecimento das hemácias de cão e cavalo serem tão intensas como as humanas, torna o teste aplicável em veterinária, em especial em casos de anemias a esclarecer, onde não exista foco evidente ou causa aparente. O anticorpo comercial testado se restringiria a espécie humana. Sabendo-se que os antígenos MNS estão relacionados com as glicoforinas, foram realizados testes nas hemácias humanas fenotipadas (parte inferior da tabela).

[040] Adicionalmente, conforme observado na FIG. 1, os anticorpos da presente invenção, quando analisados frente a extrato de membrana eritrocitária humana, apresentaram resultado superponível com aquele obtido com anticorpo monoclonal anti-glicorina A disponível no mercado (CD235a) e muito diferente do padrão da glicoforina C (CD236).

[041] Na FIG. 2, a fim de verificar a reatividade com outras espécies, foram utilizados extratos de membrana eritrocitária de cão, cavalo, coelho, suíno, rato e boi. A reação ocorre com hemácias de cão, cavalo e rato, espécies cuja carne, sabidamente não consumidas pelo ser humano, de modo geral. Estes resultados reforçam que mesmo o paciente ingerindo carne de coelho, suína e bovina, o imunossensor não reconhecerá as hemácias destes animais ingeridas pela alimentação logo, não há a necessidade dieta rigorosa para a realização do teste.

[042] Por fim, na FIG. 4, observa-se que, no tempo de 5 minutos, o imunossensor identifica a hemácia humana em 5 minutos, porém nenhuma reação de oxidação no sensor foi detectada com a hemácia de boi.

[043] No entanto, a leitura em 20 minutos requer cuidados, pois a curva de oxidação da hemácia bovina pode levar a falsos positivos.

[044] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Anticorpo monoclonal, **caracterizado** pelo fato de ser um anticorpo monoclonal murinho antiglicoforina A.

2. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ser purificado por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-sepharose.

3. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de ainda ser imobilizado em uma suspensão de 0,3 mg de óxido de grafeno reduzido (rGO), ácido 1-pireno butírico e éster N-hidroxisuccinimida (pireno-NHS).

4. Imunossensor **caracterizado** pelo fato de compreender o anticorpo monoclonal conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Imunossensor, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de ser na forma de bastão, tarugo ou imunossensor impresso.

6. Imunossensor, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, **caracterizado** pelo fato de ser preparado pelo gotejamento de 10,0 µL da solução de rGO/pireno-NHS na superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GC) previamente polido e limpo em água ultrapura e etanol.

7. Uso do imunossensor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 4 a 6, **caracterizado** pelo fato de ser para a identificação de hemácias presente nas fezes de indivíduos que possam ser portadores de anemias crônicas, emagrecimentos de causa desconhecida.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de ser como *screening* inicial para câncer de colo retal.

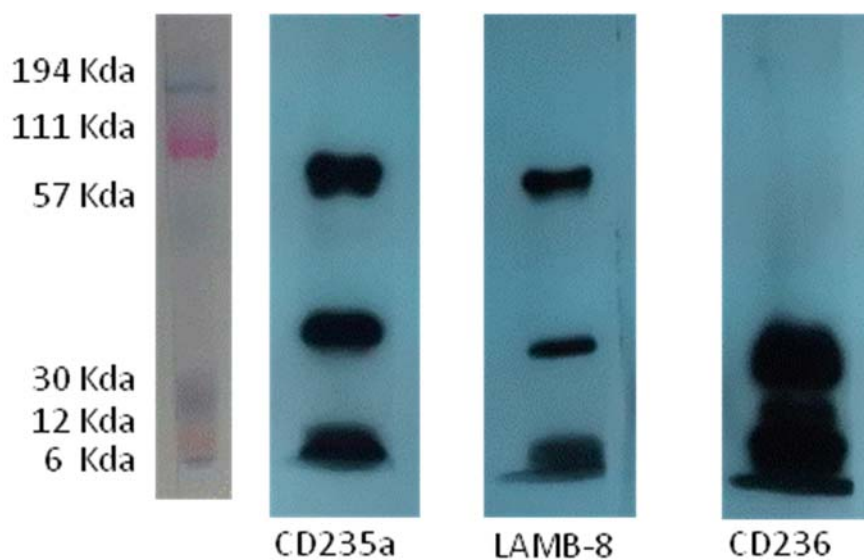


FIG. 1

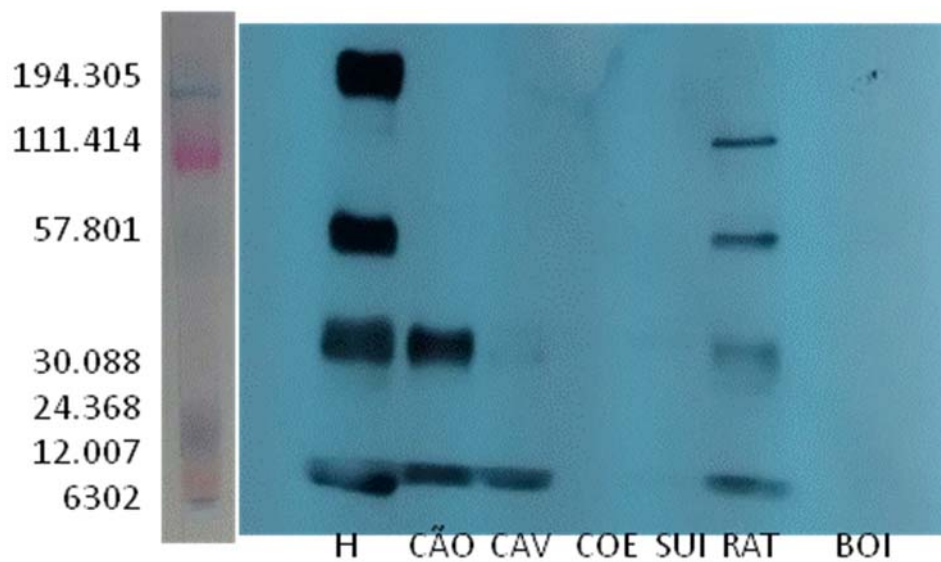


FIG. 2

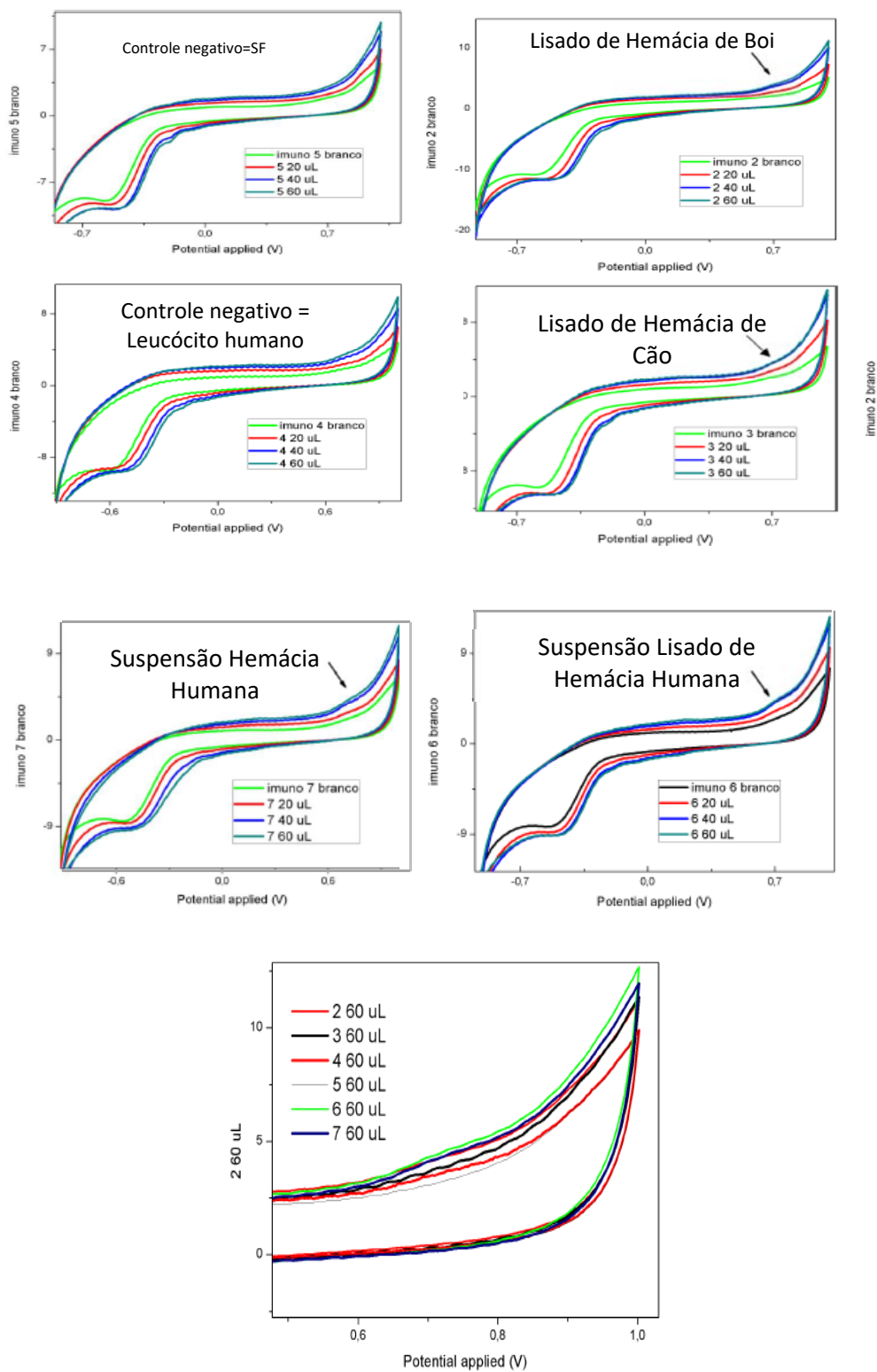


FIG. 3

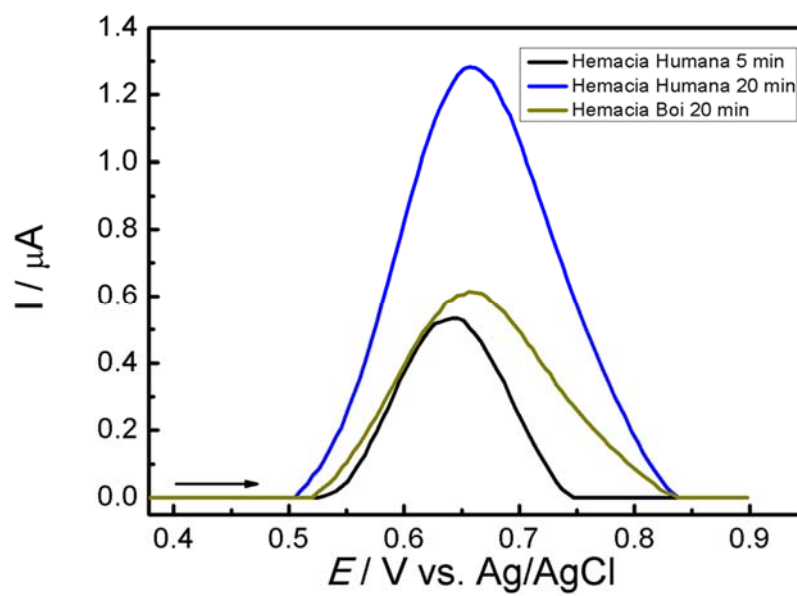


FIG. 4

RESUMO

**ANTICORPO MONOCLONAL, IMUNOSSENSOR E USO DO MESMO**

A presente invenção refere-se a um imunossensor para a detecção de sangue oculto em fezes, o qual utiliza um anticorpo monoclonal dirigido contra antígenos de alta frequência expresso em hemácias humanas, mais especificamente, anticorpo monoclonal murino anti-glicoforina A. A detecção precoce de sangue oculto em fezes permite o diagnóstico de pequenos sangramentos no trato digestivo, bem como úlceras, colite ou, até mesmo, câncer de cólon, dentre outras.