



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

(21) BR 102019002701-0 A2



(22) Data do Depósito: 08/02/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 16/11/2021

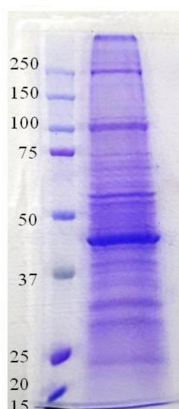
(54) **Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SENSOR IMUNOLÓGICO, SENSOR IMUNOLÓGICO, KITS COMPREENDENDO O MESMO E USO

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/566; C07K 16/28; C12N 5/0781; C12N 5/0789.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO.

(72) **Inventor(es):** ANA LÍVIA DE CARVALHO BOVOLATO; ELENICE DEFFUNE; RAFAEL FACTOR CARANDINA; JULIANE DE CAMPOS INÁCIO; MATHEUS BERTANHA; VITOR HUGO DOS SANTOS; MARLI LEITE DE MORAES; ANA LIZ GARCIA ALVES; MÁRJORIE DE ASSIS GOLIM; WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI; ANDREI MOROZ; RAFAEL PLANA SIMÕES; FAUSTO VITERBO DE OLIVEIRA NETO; ANNA LAURA YURI YOKOMICHI.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SENSOR IMUNOLÓGICO, SENSOR IMUNOLÓGICO, KITS COMPREENDENDO O MESMO E USO. A invenção descreve o processo de obtenção de um sensor imunológico, bem como o referido sensor e kits compreendendo os mesmos. O referido processo provê a geração de dois clones de células secretoras de anticorpos monoclonais murinos anti células tronco mesenquimais altamente específicos, em que estes apresentam aplicação para fins terapêuticos, diagnósticos e laboratoriais, em especial na identificação rápida de células tronco mesenquimais sem apresentar reação cruzada com leucócitos.



**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SENSOR IMUNOLÓGICO, SENSOR
IMUNOLÓGICO, KITS COMPREENDENDO O MESMO E USO**

Campo da invenção:

[001] Esta invenção se insere no campo da biotecnologia e medicina humana e veterinária e descreve o processo de obtenção de um sensor imunológico, bem como o referido sensor imunológico, kits compreendendo o mesmo e seu uso.

[002] O referido processo provê a geração de dois clones de células secretoras de anticorpos monoclonais murinos anti células tronco mesenquimais altamente específicos, em que estes apresentam aplicação para fins terapêuticos, diagnósticos e laboratoriais, em especial na identificação rápida de células tronco mesenquimais sem apresentar reação cruzada com leucócitos.

[003]

Fundamentos da invenção:

[004] Tradicionalmente, testes diagnósticos são realizados em laboratórios centrais de alta tecnologia, com equipamentos sofisticados e pessoal treinado. Como resultado, é necessário que os pacientes aguardem dias para receber seus resultados. Dessa forma, há uma crescente necessidade de fornecer resultados de diagnóstico no local de atendimento, para o tratamento imediato de doenças agudas, tal como infarto agudo do miocárdio, e para diagnóstico domiciliar, tal como monitoramento de diabetes.

[005] Em vista disso, novas tecnologias laboratoriais denominadas *Point-of-Care* (POC), também conhecidas como Testes Laboratoriais Remotos (TLR) ou Testes Rápidos (TR), tem como base a realização do teste no leito e obtenção de resultados precisos em poucos minutos. Dentre os benefícios

do POC, estão: a portabilidade, a conveniência da realização dos exames no local de atendimento do paciente, a conectividade, o interfaceamento digital com plataformas de softwares flexíveis e seguros, a velocidade de transmissão dos resultados, a simplicidade e precisão do ensaio, a manutenção do sigilo e da privacidade dos resultados e o uso cada vez menor de amostras, além da garantia da qualidade.

[006] A evolução da tecnologia impulsionou a pesquisa acadêmica e novas terminologias, tais como os dispositivos *Lab-on-a-Chip* (LOC), que consistem na miniaturização de equipamentos, tais como sensores, que possibilitou a execução de operações de laboratório em pequenas escalas.

[007] Um dos objetivos do teste POC é o desenvolvimento de um sistema baseado em chip, miniaturizado, portátil e autocontido, que permita o ensaio de diferentes analitos em amostras complexas. Para atingir esses objetivos, surgem as tecnologias relativas a eletrodos impressos. Este tipo de tecnologia tem se mostrado acessível, sensível, fácil de manusear, rápido e escalonável para fabricação.

[008] Uma vez que promove uma análise *in situ*, com facilidade de manuseio, alta precisão e desenvoltura em tempo real, os sensores biológicos têm encontrado aplicações em análise de alimentos, controle ambiental, detecção clínica e indústrias farmacêuticas e agrícolas.

[009] Os sensores biológicos ou biossensores são ferramentas biotecnológicas consideradas dispositivos analíticos que combinam a ligação de um elemento biológico com dispositivos de sinalização química (transdutores). A transdução rápida, sensível e específica de sinais

bioquímicos para a detecção quantitativa ou semi-quantitativa de analitos de interesse, são os fatores funcionais vitais para um sensor biológico ser utilizado para aplicações práticas. O principal objetivo, em qualquer tipo de combinação entre o transdutor e o elemento biológico, é a produção de um sinal que possa ser relacionado com a quantidade do analito na amostra.

[010] As interações biomoleculares registradas são transformadas em sinais eletroquímicos que são interpretados por software, proporcionando, assim, a representação da interação que ocorre entre a biomolécula receptora e o analito de interesse.

[011] Sensores biológicos usando anticorpos apresentam sensibilidades dependentes das propriedades do transdutor e da qualidade do anticorpo e são utilizados no diagnóstico clínico, devido à sua especificidade, sensibilidade, versatilidade e superioridade tecnológica. O dispositivo compreende um antígeno ou anticorpo acoplado a um transdutor de sinal, que detecta a ligação das espécies complementares. Sob esta ótica, os sensores mais usados são os sensores imunológicos eletroquímicos, cujo princípio subjacente a este formato de ensaio é o acoplamento de um anticorpo específico com um eletrodo transdutor que funciona para converter um evento de ligação (antígeno - anticorpo) em sinal elétrico.

[012] O importante avanço da Terapia Celular (TC) tem alavancado a produção de anticorpos monoclonais (AcMm) para a caracterização fenotípica das células-tronco, utilização para diagnóstico e tratamento de doenças. Os AcMm, devido a sua elevada especificidade, podem ser utilizados para

identificação de antígenos específicos, mesmo quando estes últimos estão presentes em pequenas quantidades.

[013] A técnica de produção de anticorpos monoclonais foi descrita por Köhler e Milstein em 1975 e vem sendo adaptada desde então. Tal técnica consiste em fundir uma célula tumoral com um linfócito B produtor de anticorpo de especificidade definida (antígenos de interesse). A fusão possibilita a criação de uma célula engenheirada imortalizada, denominada hibridoma, a qual possui a capacidade de originar uma linhagem única, produtora de uma imunoglobulina específica, dirigida contra um único epítopo, com alta especificidade e afinidade.

[014] Diante do fato de os anticorpos monoclonais serem considerados ferramentas diagnósticas com alto valor agregado no mercado, a presente invenção tem o objetivo de investigar a contribuição do sensor imunológico para o diagnóstico de célula-tronco mesenquimal (CTM), baseado no desenvolvimento de um sistema simples e barato através da imobilização dos anticorpos IgGanti CD90 *home made* (HM) sobre a quitosana.

[015] Um dos desafios atuais está no método de confirmação e quantificação da população celular avaliada. No entanto, a simples presença de células e sua contagem não confirma o perfil das células tronco mesenquimais e as técnicas de caracterização são demoradas, sendo elas citometria de fluxo (6 horas), diferenciação em tri-linhagem (21 dias) e biologia molecular (7 dias).

Estado da técnica:

[016] Alguns documentos do estado da técnica descrevem anticorpos monoclonais e células tronco medicinais.

[017] O documento CN 104630144 A intitulado "*Method for separating and culturing umbilical cord blood mesenchymal stem cells*", embora da mesma área tecnológica da presente invenção, aborda procedimentos de cultura de células tronco mesenquimais.

[018] No documento de anterioridade UA 74136, intitulado "*Extended panel of monoclonal antibodies for diagnostics and classification of acute leukemia*", é descrito um painel de anticorpos monoclonais contra o antígeno CD90 para uso em diagnóstico de leucemia aguda.

[019] Em DE 102004059357 A1, intitulado "*New antibody (which specifically recognizes human thiamine 1) useful for blocking the binding of human Thy-1 at its ligand or for blocking the interaction of tumor cells or immune cells with endothelial cells*", é descrito um processo de obtenção de anticorpos monoclonais anti-CD90 a partir de hibridomas e fusão celular, bem como os referidos produtos e os testes imunológicos e composições farmacêuticas que os compreendem.

[020] Cabe ressaltar que anticorpos contra um mesmo antígeno podem apresentar características não equivalentes, ou seja, reconhecendo epítomos ou grupos de epítomos totalmente distintos e, assim, conferindo diferentes níveis de especificidade aos produtos.

[021] Dessa forma, a presente invenção aparece como uma alternativa nova e inventiva às tecnologias já conhecidas, que, embora apresentem processos de obtenção e possíveis usos similares, diferem entre si com relação aos produtos, os quais raramente são equivalentes.

Breve descrição da invenção:

[022] A invenção descreve o processo de obtenção de um sensor imunológico, bem como o referido sensor e kits compreendendo o mesmo.

[023] O referido processo provê a geração de dois clones de células secretoras de anticorpos monoclonais murinos anti células tronco mesenquimais altamente específicos, em que estes apresentam aplicação para fins terapêuticos, diagnósticos e laboratoriais, em especial na identificação rápida de células tronco mesenquimais.

[024]

Breve descrição das figuras:

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

[026] As Figuras 1A e 1B representam, respectivamente, o resultado obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % corado com azul de coomassie e na técnica de *western blotting*, em que a seta indica o reconhecimento do anticorpo monoclonal.

[027] A Figura 2 são histogramas da média de intensidade de fluorescência do CD90 comercial *versus* MSC1-160A81 com CTMs de tecido adiposo de coelho (A e B), rato (C e D) e humanos (E e F) e CTM de líquido sinovial de equinos (G e H).

[028] A Figura 3 são voltamogramas de filmes automontados contendo somente quitosana associada ao anticorpo monoclonal MSC1-160A81, compreendendo 0, 1, 2, 3 ou 4 bicamadas.

[029] A Figura 4 representa a evolução da área dos voltamogramas (isto é, capacitância do sensor imunológico),

por polímero e por camada.

[030] A Figura 5 são fotografias de ensaios de biofilmes sobre lâmina de quartzo, corados com azul de tripan.

[031] A Figura 6 são voltamogramas evidenciando os picos de oxidação nos diferentes tempos, para as amostras de CTMco, CTMr, CTMh e CTMca (respectivamente, coelho, rato, humano e cavalo).

[032] A Figura 7 são voltamogramas evidenciando a ausência de picos de oxidação (controle negativo) nos diferentes tempos, para as amostras de ST, LMN e PRP de coelho, rato, humano e cavalo.

[033] A Figura 8 representa graficamente a intensidade do pico de oxidação X tempo de incubação X espécie.

[034] A Figura 9 são os voltamogramas que evidenciam os picos de oxidação em relação à concentração celular (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5) com diferentes tempos de incubação para CTMco (coelho), em que (A) são os picos de oxidação em destaque e (B) são os picos isolados para melhor avaliação.

[035] A figura 10 representa graficamente a intensidade do pico X tempo de incubação X concentração celular, com CTMco.

Descrição detalhada da invenção:

[036] A presente invenção faz referência ao processo de obtenção de um sensor imunológico, bem como o referido sensor imunológico, kits compreendendo o mesmo e seu uso.

[037] O sensor imunológico apresenta especificidade para o reconhecimento de células tronco mesenquimais (CTMs) de diferentes espécies, como coelho, rato, cavalo e seres humanos, e compreende um anticorpo *home made* (HM) acoplado.

[038] Inicialmente, é necessário identificar os clones produtores de anticorpos monoclonais anti-CTM e, dentre estes, aqueles que apresentam melhor rendimento em cultura.

[039] Em seguida, para a obtenção do sensor imunológico da presente invenção, foi utilizado, como polímero, uma solução de quitosana em uma concentração que varia de 0,05 a 5%, preferencialmente 0,2 %, utilizando a técnica LbL (*layer-by-layer*).

[040] Em uma modalidade alternativa, solução de fibroína em uma concentração que varia de 0,05 a 3%, preferencialmente 0,1 %, e polietilenoimina (PEI) em uma concentração que varia de 0,5 mg/ml a 1,5 mg/ml, preferencialmente 1 mg/mL podem ser utilizados em substituição à solução de quitosana.

[041] Em outra modalidade alternativa, a imobilização de proteínas pode ser realizada por diferentes técnicas, como a imobilização por reticulação, filmes Langmuir-Blodgett (LB) e monocamadas automontadas (*self-assembled monolayer*, SAM).

[042] Os sensores apresentaram de 1 a 4 camadas bicamadas de quitosana / IgG anti-CD90 HM previamente purificado pelo método de cromatografia de afinidade utilizando colunas HiTrap®, mais preferencialmente 4 bicamadas.

[043] O referido processo provê a geração de clones de células secretoras de anticorpos monoclonais murinos anti CTM altamente específicos, em que estes apresentam aplicação para fins terapêuticos, diagnósticos e laboratoriais, em especial na identificação rápida de CTMs sem apresentar reação cruzada com leucócitos.

[044] Devido ao fato de apresentarem alta sensibilidade e especificidade, os sensores imunológicos aqui descritos podem ser utilizados em diagnósticos envolvendo técnicas laboratoriais, como citometria de fluxo, *western blotting*, *whole cell*, ELISA, imunohistoquímica e imunofluorescência.

[045] Esta invenção ainda prevê um kit, o qual compreende o sensor imunológico, tampões de diluição (PBS) e amostras controle positivo e negativo.

Testes realizados:

[046] De acordo com esta invenção, foi estabelecido um protótipo do sensor imunológico, a fim de identificar CTMs de tecido adiposo de coelhos. As etapas de desenvolvimento estão listadas a seguir:

Identificação dos clones produtores de anticorpos monoclonais anti-CTM de coelho:

[047] Inicialmente, foram identificados nove clones secretores de imunoglobulina com reconhecimento específico de antígeno na superfície das CTMs (vide tabela 1).

[048] Todos os clones foram descongelados e amplificados em banho de cultura na presença de meio RPMI-1640 aditivado com 10 % de SFB. Esta etapa teve como objetivo analisar o clone que apresentasse melhor rendimento em cultura.

[049] Desta forma, o clone denominado MSC1-160A81 foi o que teve a melhor curva de crescimento em menor tempo, favorecendo a obtenção de maior concentração de anticorpo.

Tabela 1- Identificação dos clones produtores de anticorpos monoclonais anti-CTM de coelho, número de células iniciais, viabilidade e tempo de crescimento.

Clones	Número de	Viabilidade	Tempo de
---------------	------------------	--------------------	-----------------

	células		crecimento
MSC1-160 A20	0,73 X 10 ⁶	83,1 %	15 dias
MSC1-160 A30	0,97 X 10 ⁶	98,4 %	15 dias
MSC1-160 A41	0,56 X 10 ⁶	71,4 %	15 dias
MSC1-160 A47	0,62 X 10 ⁶	67,2 %	15 dias
MSC1-160 A55	0,71 X 10 ⁶	75,6 %	15 dias
MSC1-160 A60	0,83 X 10 ⁶	87,3 %	15 dias
MSC1-160 A63	0,89 X 10 ⁶	89,5 %	15 dias
MSC1-160 A81	1,52 X 10 ⁶	99,1 %	15 dias
MSC1-160 A82	0,82 X 10 ⁶	84,3 %	15 dias

Determinação da intensidade de reatividade do anticorpo monoclonal:

[050] Para a produção do anticorpo monoclonal de acordo com a invenção, foram testados os clones com CTM de duas diferentes origens: medula óssea e tecido adiposo.

[051] Cabe ressaltar que, no entanto, estes testes foram realizados com apenas uma amostra de tecido adiposo e com anticorpos na fase de hibridomas, ou seja, antes da clonagem celular. Este último fato leva a crer que, após a clonagem, o desempenho global dos anticorpos seja melhor.

[052] Os resultados estão disponíveis na tabela 2.

Tabela 2 - Desempenho dos diferentes clones pela técnica de citometria de fluxo com CTM de medula óssea e tecido adiposo de coelho

Clones	CTM-MO coelho	CTM-TA coelho
MSC1-160 A20	39,63	70,44
MSC1-160 A30	53,83	84,54
MSC1-160 A41	41,3	60,63
MSC1-160 A47	37,26	68,16
MSC1-160 A55	40,7	56,67

MSC1-160 A60	42,26	44,32
MSC1-160 A63	50,52	52,33
MSC1-160 A81	39,52	54,59
MSC1-160 A82	36,95	55,6
Média	42,44	60,81

[053] Como pode ser observado, o rendimento da média de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo foi de 42,44 % para CTM de medula óssea e 60,81 % para CTM de tecido adiposo, ambos de coelho.

Teste de eletroforese em gel de poliacrilamida e Western blotting:

[054] O perfil das proteínas extraídas pelo método de lisado ficou claro após o teste de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % (figura 1A).

[055] Em seguida, após a transferência para a membrana de PVDF para o teste de *western blotting* (figura 1B), foi possível identificar o reconhecimento de uma banda de peso molecular entre 24 e 30 kDa, correspondendo ao peso molecular do anti-CD90.

Citometria de fluxo:

[056] Foram utilizados marcadores comerciais que apresentam reação cruzada com coelho: CD90, CD44, CD71 e CD73. Cabe ressaltar que o CD90 é tido como marcador de CTM de diferentes espécies, não apresentando reatividade em outras células à exceção de vasos sanguíneos.

[057] Como pode ser observado na tabela 3, o anticorpo produzido *home made* apresenta um desempenho superior ao anticorpo CD90 de rato com reação cruzada com coelho. Observa-se que a média de intensidade de fluorescência das 65 amostras analisadas com o reagente comercial foi de

79,04 %, enquanto que o clone MSC1-160A81 da presente invenção teve um desempenho de 99,51 %. O mesmo pode ser observado quando as células eram oriundas da linhagem HUVEC - ATCC CRL -1730.

Tabela 3 - Intensidade de fluorescência de marcadores comerciais e o anticorpo da invenção

Marcador	n	Hemácia	Leucócito	Linfócito	CTM	HUVEC
CD90	65	0	0	0	79,04	58,66
MSC1-160A81	65	0,5	0,65	0,86	99,51	37,8
CD44	3	32,53	0	0	52,5	NT
CD71	3	0	0	35,84	55,05	NT
CD73	3	0	8,36	0	84,5	NT

[058] A superioridade da reação do anticorpo produzido *home made* é facilmente observada nos histogramas de distribuição das células analisadas pela técnica de citometria de fluxo, com CTMs de coelho, rato, cavalo e humanas (figuras 2A - H).

[059] O histograma do anticorpo comercial CD90 foi selecionado para esta ilustração, tendo em vista que todas as técnicas apontam este perfil de reconhecimento. O anticorpo produzido não reconhece o mesmo epítipo do comercial, uma vez que o teste de inibição mostrou reconhecimento diverso.

[060] Destaca-se que, para as espécies de coelho, rato e humanas, a origem das CTM foi de tecido adiposo. Para os equinos, o CTM é oriundo de líquido sinovial. Ressalta-se, ainda, que estas células foram caracterizadas pelos mesmos critérios, atendendo rigorosamente a todos.

[061] Estabelecidos os critérios para a determinação da

especificidade do anticorpo, iniciaram-se as etapas de construção do sensor imunológico.

Otimização de parâmetros para construção do sensor:

[062] Os sensores imunológicos da presente invenção foram construídos utilizando, como polímero, uma solução de quitosana a 0,2 % utilizando a técnica LbL.

[063] Foram testadas 0 (PBS), 1, 2, 3 e 4 bicamadas de quitosana e anticorpo monoclonal purificado, sendo o acompanhamento realizado por voltametria cíclica.

[064] Os voltamogramas obtidos para filmes automontados contendo somente quitosana associada ao anticorpo monoclonal MSC1-160A81 (de especificidade CD90 *home made*) são mostrados na figura 3.

[065] Os voltamogramas obtidos para os filmes automontados contendo quitosana / anticorpo monoclonal estão apresentados na figura 3 e mostram a deposição deste polímero em maior quantidade, acarretando um aumento da área do voltamograma.

[066] A partir desses resultados, foi determinada a capacitância do sensor imunológico através do cálculo das áreas dos voltamogramas *versus* número de camadas depositadas para a solução de quitosana. Na figura 4, é possível observar uma maior área para o sistema de solução de quitosana, indicando um aumento da densidade eletrônica no filme contendo quitosana.

[067] Para a confirmação da adsorção do anticorpo anti-CD90 HM sobre os filmes de quitosana 0,2 % e a identificação de reações específicas, CTM / anti-CTM, foram realizados ensaios do biofilme sobre lâmina de quartzo (figura 5).

[068] A figura 5A mostra filmes automontados na presença de sangue total (ST). O aspecto é praticamente nulo (reação negativa), com pequenos artefatos visíveis na ponta da seta. Este achado pode ser justificado por impurezas (partículas) existentes na formulação da quitosana ou sais do PBS que aderiram na quitosana.

[069] Na figura 5B, a reação das CTM com anticorpo anti-CD90 HM sobre o biofilme (com aumento 5X). Na figura 5C, o mesmo aspecto é observado sob um aumento de 10X, melhor evidenciando a presença das células. Este ensaio comprova que as CTM são ligadas de forma específica com o anticorpo.

[070] Diante destes resultados, foi montado um lote de sensor imunológico desta invenção utilizando, como matriz, a quitosana com 4 bicamadas + CD90 HM, para testes com cinco diferentes amostras de CTMco (coelho), duas amostras de CTMr (rato), duas amostras de CTMh (humano) e outras duas de CTMca (cavalo), já testadas por citometria de fluxo com anticorpo comercial e o CD90 HM.

[071] As leituras foram realizadas nos tempos 5', 10', 20', 30', 60', 90' e 120 minutos (vide figuras 6). Foram constituídas amostras para os controles negativos, a partir de sangue de coelho, compreendendo sangue total (ST), plasma rico em plaquetas (PRP) e Buffycoat (camada leucocitárias, LMN).

[072] Para todos eles, não foram observados pico de oxidação em nenhum dos tempos avaliados. Logo, foram consideradas reações totalmente negativas (vide figura 7). Este fato é relevante pois, durante uma cirurgia de lipoaspiração ou retirada de pequeno bloco de tecido

adiposo para extração de CTM para uso imediato, há sempre a presença de grande quantidade de hemácias, leucócitos e proteínas plasmáticas. É extremamente relevante determinar que o anticorpo CD90 HM não apresenta reação inespecífica em teste rápido, como o uso de sensor imunológico.

[073] Após a interpretação dos resultados anteriores foi utilizado o teste de correlação de Spearman para verificar se existe correlação entre o tempo de incubação e a intensidade máxima do pico de oxidação nos experimentos de voltametria cíclica entre todas as espécies analisadas.

[074] Os resultados podem ser observados na tabela 4 abaixo.

Tabela 4 - Teste de correlação de Spearman: intensidade do pico de oxidação X tempo de incubação X espécie incubação X espécie

	Coel ho1	Coel ho2	Coel ho3	Coel ho4	Coel ho5	Cava lo1	Cava lo2	Rato1	Rato2	Hum1	Hum 2
Coelho1	1,00										
Coelho2	0,66	1,00									
Coelho3	0,81	0,95	1,00								
Coelho4	0,74	0,96	0,99	1,00							
Coelho5	0,78	0,91	0,96	0,97	1,00						
Cavalol1	0,76	0,75	0,87	0,88	0,88	1,00					
Cavalol2	0,81	0,86	0,92	0,94	0,96	0,92	1,00				
Rato1	0,73	0,99	0,97	0,96	0,90	0,76	0,86	1,00			
Rato2	0,43	0,95	0,85	0,90	0,82	0,72	0,78	0,91	1,00		
Humano1	0,75	0,96	0,93	0,93	0,91	0,69	0,87	0,96	0,84	1,00	
Humano2	0,51	0,97	0,88	0,93	0,88	0,70	0,84	0,93	0,97	0,92	1,00

**Valores acima de 0,75 podem ser considerados fortemente correlacionados.*

[075] Os resultados mostram que, de maneira geral,

existe um comportamento comum para todas as amostras das diferentes espécies analisadas, ou seja, o padrão de variação da intensidade máxima do pico de oxidação é o mesmo para todas as espécies.

[076] Essa afirmação fica evidente ao analisar os picos de oxidação para todas as espécies em função do tempo de incubação, conforme ilustrado na figura 8 a seguir. É possível observar que 30 minutos é o tempo ótimo de incubação, em que as barras de erro sobre cada ponto da curva média apresentada no gráfico correspondem aos respectivos desvios padrões considerando todas as espécies.

[077] Os dados da intensidade do pico de oxidação em função da concentração celular de 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 foram plotados para os tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos, como pode ser observado na figura 9.

[078] Nota-se que a voltametria cíclica (VC) com o tempo de incubação de 5 minutos, independente do aumento da concentração, não apresentou pico. O primeiro pico fica evidente com o tempo de incubação de 10 minutos com a concentração de 10^5 . No tempo de 20 minutos, o primeiro pico aparece com a concentração de 10^3 e se repete com as concentrações de 10^4 e 10^5 , no entanto, praticamente não há variação em sua intensidade. Para a incubação de 30 minutos, o primeiro pico também ocorre na concentração de 10^3 , porém, para esse, a intensidade do pico se eleva conforme se aumenta a concentração celular.

[079] Na figura 10, os resultados que relacionam a concentração em função do tempo de incubação também são evidenciados. Na figura 10A, o eixo x está em escala logarítmica e, na figura 10B, o eixo x está em escala

decimal, sendo as análises melhor ilustradas na primeira escala.

[080] Foi feita uma regressão linear utilizando os pontos da curva média da figura 10B, obtendo o coeficiente de determinação $R = 0,95991$ e o valor de $p = 0,00958$. Como a figura 10A está em escala logarítmica, esse resultado revela que, estatisticamente, a variação do pico de oxidação em função da concentração celular tem comportamento logarítmico, ou seja, existe um ponto de saturação para o qual o pico não deverá mais aumentar mesmo aumentando a concentração celular, como é evidenciado na figura 10B.

[081] Estas análises destacam que a sensibilidade do protótipo do sensor imunológico tem sua prova de conceito totalmente validada e indica que baixas concentrações (de cerca de 1000 células) podem ser detectadas pelo sensor a partir de uma leitura em 20 minutos. Em citometria de fluxo, o tempo de análise médio é de 2 horas e meia, com uma concentração mínima muito mais elevada. São necessárias 2×10^5 células para que o resultado seja validado.

[082] Além da sensibilidade, o sensor imunológico proposto também apresenta uma eletroatividade relevante, apresentando na maioria dos testes um pico de oxidação em torno de 0,28V, com pequena variação de 0,26V a 0,3V.

[083] 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. Processo de obtenção de sensor imunológico **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:

a. identificação dos clones produtores de anticorpos monoclonais anti-CTM e, dentre estes, aqueles que apresentam melhor rendimento em cultura;

b. montagem dos sensores utilizando a técnica LbL e polímero.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa (a), os anticorpos monoclonais reconhecerem células tronco mesenquimais de espécies selecionadas dentre coelho, rato, cavalo e seres humanos.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa (b), o polímero ser selecionado dentre solução de quitosana em uma concentração que varia de 0,05 a 5%, solução de fibroína em uma concentração que varia de 0,05 a 3%, preferencialmente 0,1 % e polietilenoimina (PEI) em uma concentração que varia de 0,5 mg/mL a 1,5 mg/mL, preferencialmente 1 mg/mL, preferencialmente solução de quitosana em uma concentração de 0,2 %.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, alternativamente, a montagem dos sensores utilizar técnicas selecionadas dentre imobilização por reticulação, filmes Langmuir-Blodgett (LB) e monocamadas automontadas (SAM).

5. Sensor imunológico, obtido conforme o processo definido nas reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de apresentar de 1 a 4 bicamadas de quitosana e anticorpo

IgG anti-CD90 homemade previamente purificado pelo método de cromatografia de afinidade, preferencialmente 4 bicamadas.

6. Kit **caracterizado** pelo fato de compreender o sensor imunológico, tampões de diluição (PBS) e amostras controle positivo e negativo.

7. Uso do sensor imunológico, conforme definido na reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de ser para fins terapêuticos, diagnósticos e laboratoriais.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de os diagnósticos envolverem técnicas laboratoriais, como citometria de fluxo, *western blotting*, *whole cell*, ELISA, imunohistoquímica e imunofluorescência.

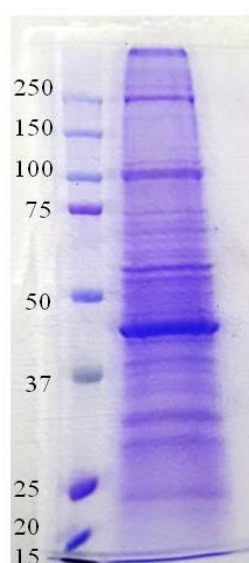


FIGURA 1A

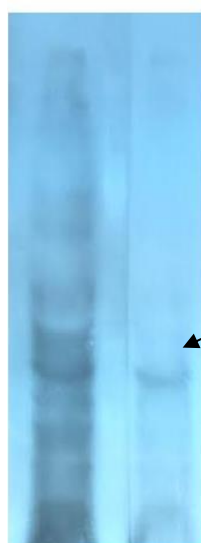


FIGURA 1B

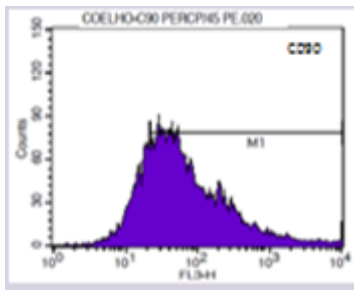


FIGURA 2A

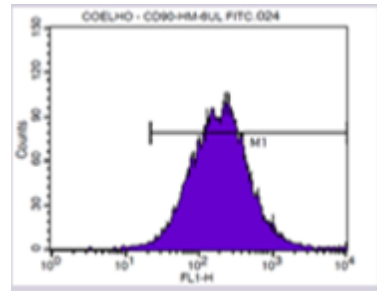


FIGURA 2B

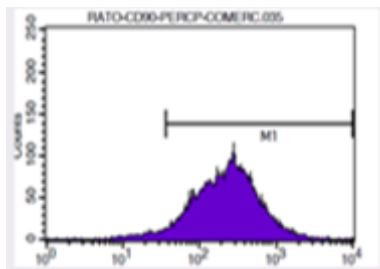


FIGURA 2C

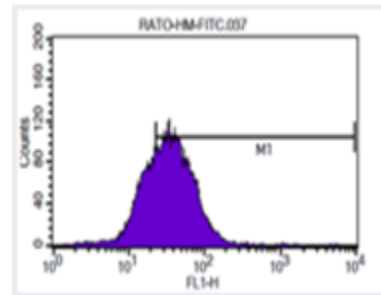


FIGURA 2D

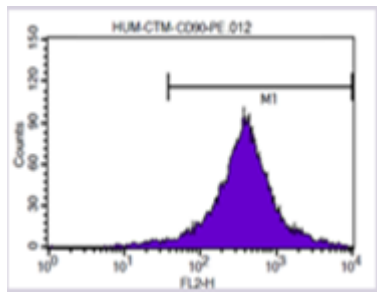


FIGURA 2E

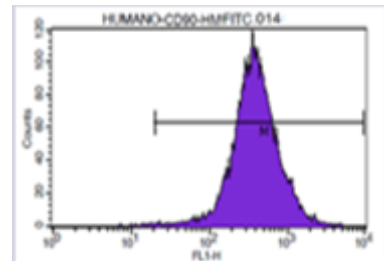


FIGURA 2F

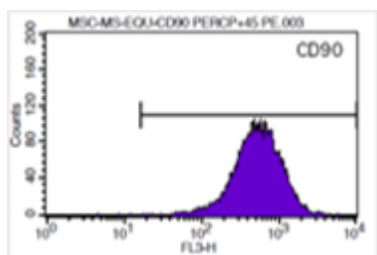


FIGURA 2G

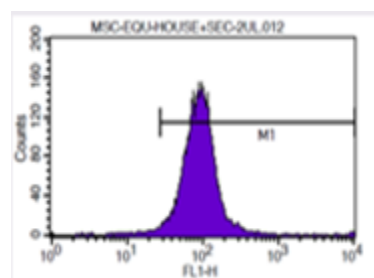


FIGURA 2H

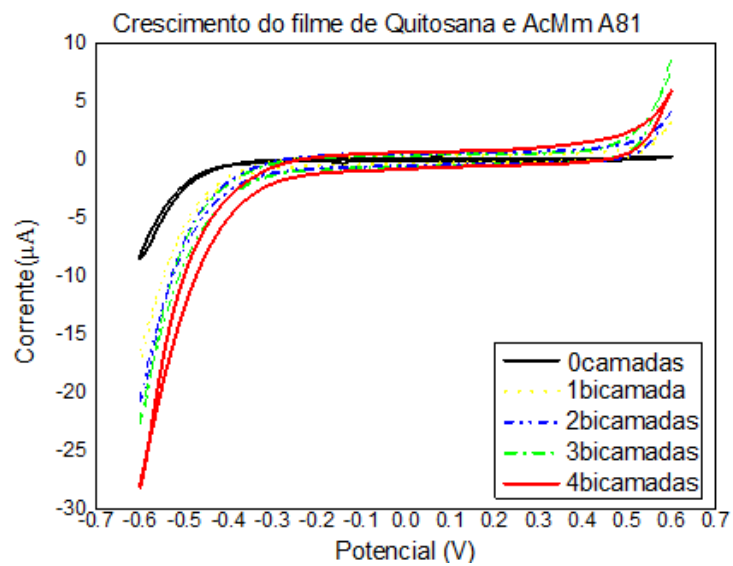


FIGURA 3

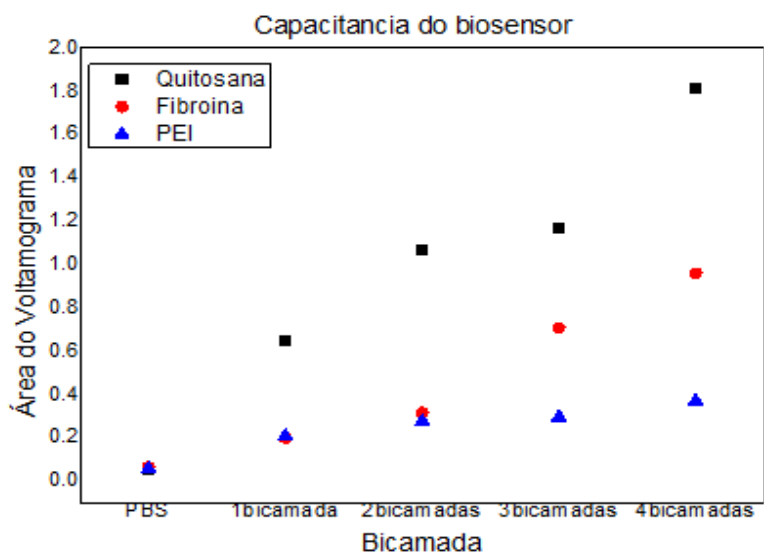


FIGURA 4

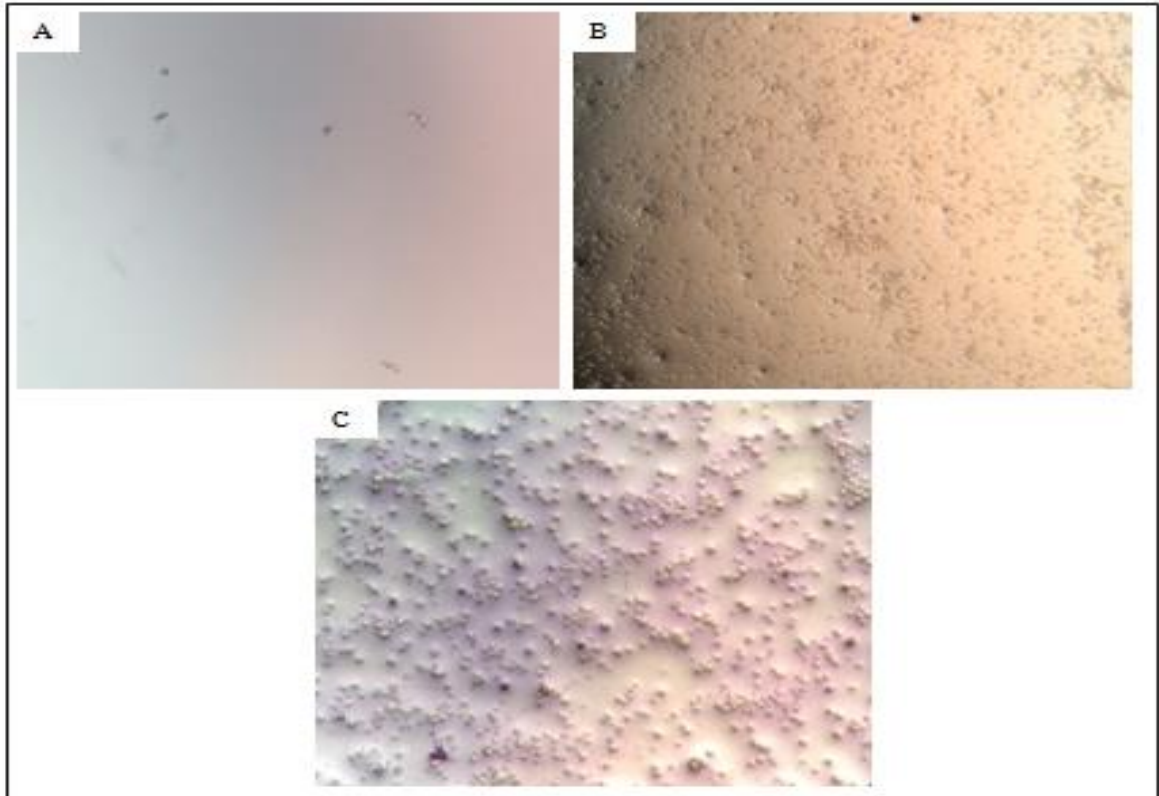


FIGURA 5

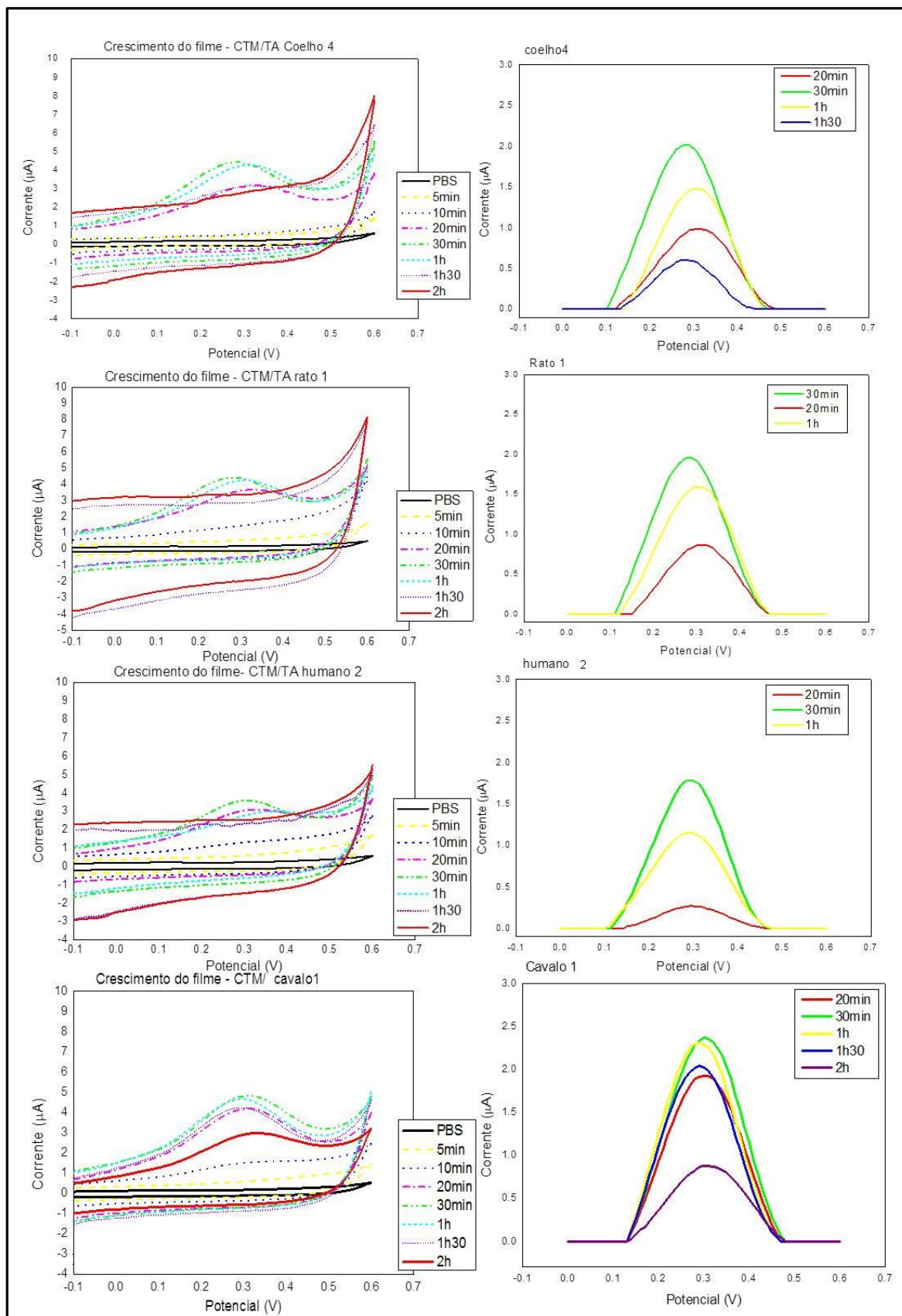


FIGURA 6

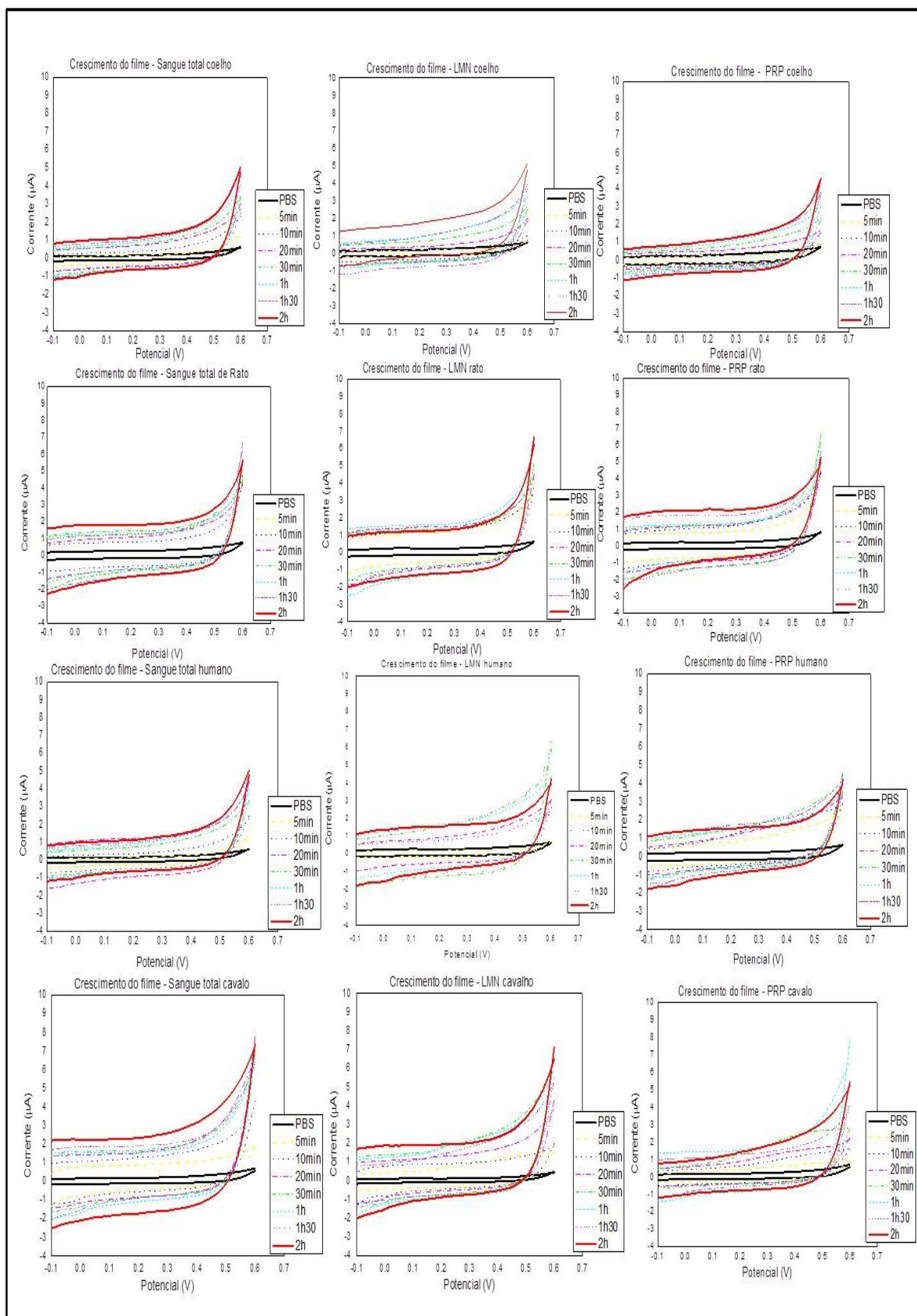


FIGURA 7

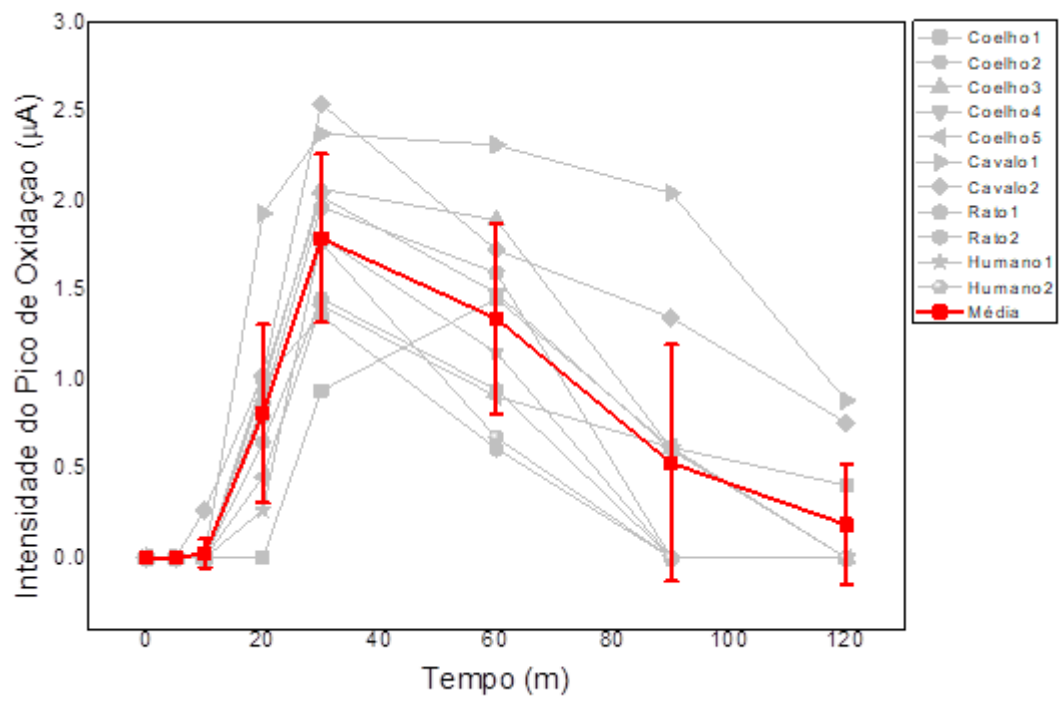


FIGURA 8

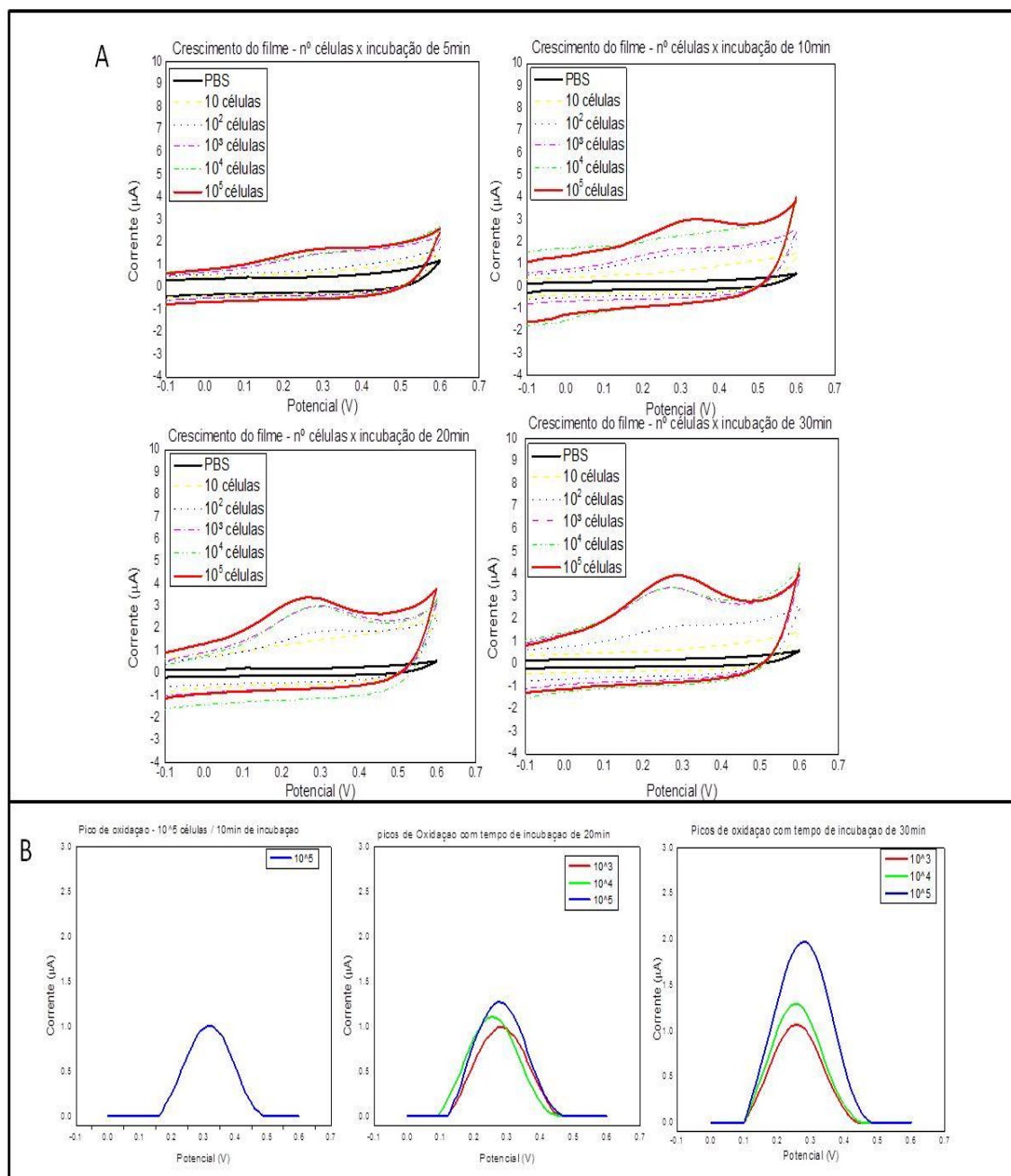


FIGURA 9

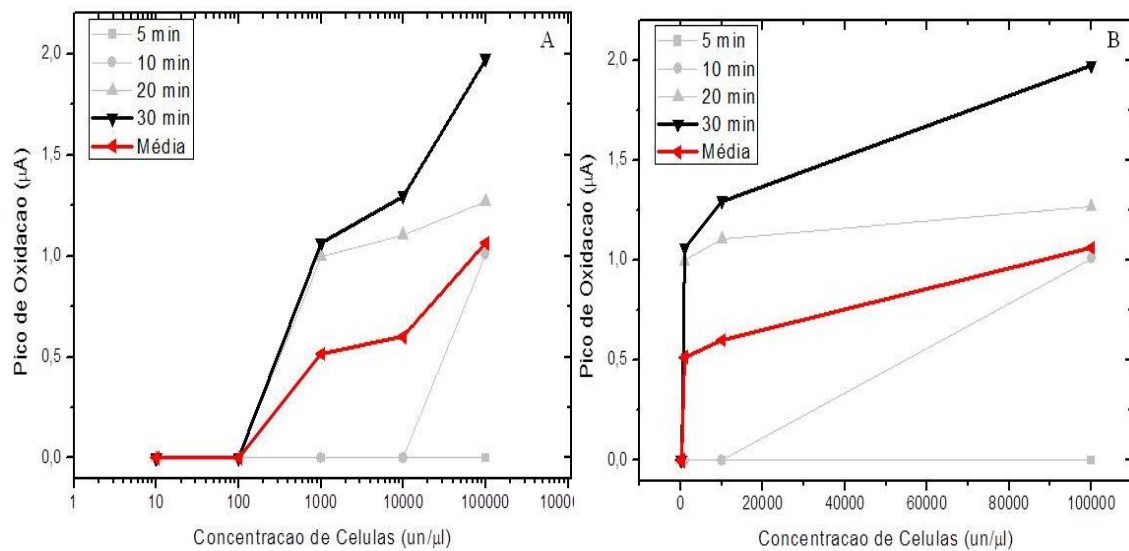


FIGURA 10

Resumo

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SENSOR IMUNOLÓGICO, SENSOR
IMUNOLÓGICO, KITS COMPREENDENDO O MESMO E USO**

A invenção descreve o processo de obtenção de um sensor imunológico, bem como o referido sensor e kits compreendendo os mesmos. O referido processo provê a geração de dois clones de células secretoras de anticorpos monoclonais murinos anti células tronco mesenquimais altamente específicos, em que estes apresentam aplicação para fins terapêuticos, diagnósticos e laboratoriais, em especial na identificação rápida de células tronco mesenquimais sem apresentar reação cruzada com leucócitos.