

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional
05 de Agosto de 2021 (05.08.2021)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2021/151180 A2

(51) Classificação Internacional de Patentes:
Sem classificação

(21) Número do Pedido Internacional:

PCT/BR2021/050007

(22) Data do Depósito Internacional:

12 de Janeiro de 2021 (12.01.2021)

(25) Língua de Depósito Internacional:

Português

(26) Língua de Publicação:

Português

(30) Dados Relativos à Prioridade:

BR102020002165-6

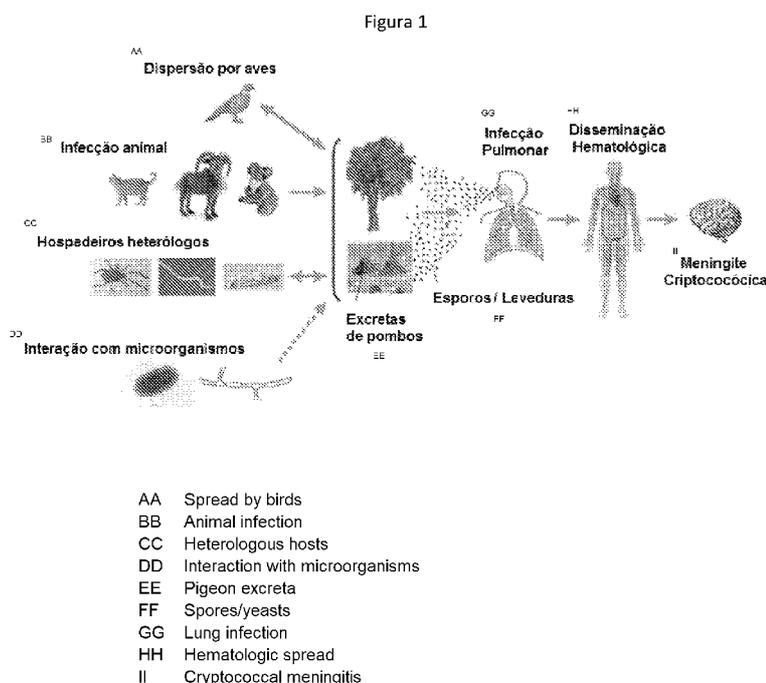
31 de Janeiro de 2020 (31.01.2020) BR

(71) Requerente: **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ** [BR/BR];
Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ (BR).

(72) Inventores: **FIGUEIREDO, Alexandre, Bezerra, Conde**; Rua Desembargador Izidro 129/202 – Tijuca, 20521-160 Rio de Janeiro - RJ (BR). **RODRIGUES, Marcio, Lourenco**; Avenida Água Verde 1575, apto 201, torre 2, 80620-200 Curitiba - PR (BR). **CONTE, Fernando, de Paiva**; Av. Vice Presidente José Alencar 1515/412 B11 – Jacarepague, 22775-033 Rio de Janeiro - RJ (BR). **FONSECA, Fernanda, Lopes**; Rua Joaquim Pinheiro, 290/407 Freguesia, Jacarepague, 22743-660 Rio de Janeiro - RJ (BR). **ARISSAWA, Marcia**; Travessa Gastão Ruch, 11/1104 – Icarai, 24220-100 Niterói - RJ (BR).

(54) Title: ANTIBODY, RELATED USE, PHARMACEUTICAL COMPOSITION INCLUDING METHOD FOR DIAGNOSING FUNGAL INFECTIONS, FUNGAL INFECTION DIAGNOSIS KIT AND METHOD FOR TREATING FUNGAL INFECTIONS

(54) Título: ANTICORPO, SEU USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA O COMPREENDENDO, MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE INFEÇÕES FÚNGICAS, KIT DE DIAGNÓSTICO DE INFEÇÕES FÚNGICAS E MÉTODO PARA TRATAMENTO DE INFEÇÕES FÚNGICAS



(57) Abstract: The present invention provides monoclonal antibodies against chitin oligomer using the hybridoma technique. Said antibodies can be used as tools for diagnosing and treating fungal infections. Pharmaceutical compositions and kits for treating fungal infections including said antibodies are also disclosed. A method for diagnosing fungal infections using said antibodies and the use thereof in the preparation of a drug for treating fungal infections are also disclosed.

(57) Resumo: A presente invenção fornece anticorpos monoclonais contra oligômero de quitina através da técnica de hibridomas. Os

(Continua na página seguinte)



WO 2021/151180 A2

(74) **Mandatário: KASZNAR LEONARDOS PROPRIEDA-
DE INTELLECTUAL**; RUA TEÓFILO OTONI 63 - 8TH
FLOOR, 20090-080 Rio De Janeiro (BR).

(81) **Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados Designados** (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- *sem relatório de pesquisa internacional; será republicado após recepção do mesmo (Regra 48.2(g))*
- *com listagem de sequências, parte da descrição (Regra 5.2(a))*
- *em preto e branco; o pedido internacional tal como depositado contém cores ou níveis de cinza e pode ser baixado do PATENTSCOPE*

referidos anticorpos podem ser utilizados como ferramentas para diagnóstico e tratamento de infecções fúngicas. Também são reveladas composições farmacêuticas e kits para tratamento de infecções fúngicas compreendendo os referidos anticorpos. Ademais são revelados ainda um método de diagnóstico de infecções fúngicas utilizando os referidos anticorpos e o seu uso na preparação de um medicamento para tratar infecções fúngicas.

ANTICORPO, SEU USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA O
COMPREENDENDO, MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES
FÚNGICAS, KIT DE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES FÚNGICAS E
MÉTODO PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES FÚNGICAS

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se ao campo da medicina diagnóstica, da biotecnologia e biofármacos. Especificamente, a presente invenção refere-se anticorpos monoclonais para uso terapêutico contra infecções fúngicas, bem como na aplicação diagnóstica de infecções fúngicas em qualquer indivíduo humano ou animal.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Fungos são organismos eucarióticos e saprófitos com uma parede celular rígida que constituem cerca de 5 milhões de espécies no planeta (1). Em comparação com plantas, que também consistem de células eucarióticas contendo parede celular, ressalta-se a diferença de que as células fúngicas têm paredes celulares que contêm quitina, ao contrário de células de plantas, que contêm celulose.

[003] Os fungos apresentam grande diversidade morfológica, incluindo dois morfotipos principais: as leveduras, formas unicelulares arredondadas, ovais ou esféricas, e os filamentos, que se apresentam na forma de hifa e são multicelulares. As leveduras consistem de células que se reproduzem por brotamento único ou múltiplo. Os fungos filamentosos apresentam como morfologia básica a hifa, que pode ser septada ou não septada. Ressalta-se a existência de fungos dimórficos, que podem viver tanto na forma de levedura quanto na forma de hifa dependendo de variações ambientais que guiam a transição entre os estados morfológicos.

[004] O Reino Fungi é dividido em quatro filos: Ascomicota, Basidiomicota, Zigomicota e Quitridiomicota. Os filos Ascomicota e Basidiomicota abrigam vários patógenos de animais e plantas, incluindo os

patógenos humanos *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis* (2)

[005] As micoses sistêmicas, quadros que resultam das infecções fúngicas invasivas (IFI), representam uma das principais causas de morte de humanos no mundo (3). De acordo com dados apresentados pelo Fundo Global de Ações contra Infecções Fúngicas (GAFFI, da denominação em inglês *Global Action Fund for Fungal Infections*), mais de 300 milhões de pessoas de todas as idades sofrem de alguma infecção fúngica grave a cada ano no globo. É estimado que, nesse grupo, mais de 1,6 milhões de pessoas morrerão, sendo essas estatísticas comparáveis às observadas para tuberculose e 3 vezes maior que a malária.

[006] O aumento da incidência atual de IFI é em grande parte resultado de uma escalada substancial nas últimas décadas de condições imunossupressoras, como a infecção pelo HIV e o uso de fármacos indutores de imunossupressão (4). Além disso, o uso de antineoplásicos e antibióticos de amplo espectro, além de intervenções médicas invasivas (5), também contribui diretamente com o aumento das IFIs.

[007] As micoses sistêmicas podem afetar qualquer órgão do hospedeiro. A classificação de doenças fúngicas nessa categoria é dinâmica e altamente variável, como ilustrado pela observação de que espécies anteriormente consideradas não patogênicas são agora reconhecidas como patógenos responsáveis por micoses invasivas (6). Essas infecções são muito comuns em pacientes imunocomprometidos e frequentemente estão associadas a uma elevada taxa de mortalidade (4). Os gêneros mais frequentes envolvidos nas infecções fúngicas sistêmicas são *Candida*, *Pneumocystis*, *Histoplasma*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Coccidioidomyces* (Tabela 1).

Tabela 1: Estimativas globais e mortes relacionadas de infecções por fungos por ano entre pessoas com HIV

Infecção Fúngica	Carga Anual	Taxa de letalidade caso tratada	Estimativa anual de morte
Meningite Criptocócica	~ 1 milhão	>50%	~100.000 - 600.000
Pneumonia Pneumocística	>400.000	15% com o melhor tratamento	>200.000
Histoplasmose disseminada	>100.000	15-30%, se diagnosticada e tratada	>80.000
Aspergilose pulmonar crônica	>185.000	15-40% em hospitais	>100.000
Aspergilose invasiva	>45.000	30% tratadas em hospitais	>30.000
Infecção <i>T.marneffei</i>	>8.000	33%	>2.000
Infecção fúngica na pele e mucosa	>10 milhões	<1%	<1.000
Total	>11 milhões		>500.000

[008] Os fungos patogênicos para os seres humanos existem em muitos habitats naturais, mas as IFIs são geralmente observadas em climas tropicais e subtropicais (7,8). Especula-se que o aumento das mudanças climáticas pode ter alterado a distribuição das doenças e, conseqüentemente, levado ao aparecimento de fungos patogênicos em novas áreas geográficas (7). Por exemplo, o Nordeste dos Estados Unidos registrou 100 casos de doença por *C. gattii* pertencente ao tipo molecular VGII, normalmente encontrado na América do Sul (9). Entretanto, esse surto foi registrado em uma região temperada dos EUA (10). Cabe ressaltar que os fungos são armados com um arsenal de características que facilitam a adaptação e colonização de novos nichos e, conseqüentemente, a capacidade de sobreviver às condições fisiológicas do hospedeiro e de alternar entre diferentes estados morfológicos (11). Dentre as adaptações mais comuns em fungos patogênicos está a capacidade de crescer a 37°C (12), mudanças de forma e tamanho, capacidade de escapar de macrófagos (13,14), melanizar e formar biofilme (15).

[009] Cabe destacar que espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, e *Pneumocystis* são responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de morte de humanos (11). Estimativas globais recentes registram mais de 11 milhões de infecções fúngicas associadas a pacientes HIV-positivos, resultando em mais de 500 mil mortes

anuais (Tabela 1).

[0010] Segundo o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC, EUA), os fungos são os agentes mais frequentemente associados à mortalidade por meningite microbiana. Estima-se que cerca de um milhão de casos de meningite causadas pelo fungo *C. neoformans* ocorrem anualmente, resultando em mais de duzentas mil mortes 3 meses após a infecção (16).

[0011] Apesar da alta taxa de mortalidade associada a diferentes tipos de infecções fúngicas, as estratégias terapêuticas recomendadas mantêm-se quase as mesmas desde a década de 1950 quando comparadas aos tratamentos de infecções bacterianas (18). Atualmente, existem quatro classes principais de fármacos antifúngicos: os azóis, os polienos, análogos de pirimidinas e as equinocandinas. Várias outras classes, como, morfolinas e alilaminas, são usadas apenas como agentes tópicos devido à baixa eficácia ou efeitos adversos graves, quando administradas sistemicamente.

[0012] Porém, o uso intensivo e indiscriminado de medicamentos pertencentes a essas classes propiciou a seleção de isolados multirresistentes a fármacos antifúngicos (19), que apesar de raro tem apresentado destaque, principalmente no caso de espécies de *Candida*. O surgimento de isolados multirresistentes a fármacos antifúngicos também representa, neste momento, uma grande ameaça global à saúde pública. Um exemplo deste grave problema foi demonstrado no início de 2009, quando foi descrita no leste da Ásia, uma espécie de *Candida* resistente ao Fluconazol (FLC), a *Candida auris*. Atualmente, esta espécie encontra-se amplamente difundida nos cinco continentes e é reconhecidamente descrita por exibir um perfil multirresistente a fármacos (20).

[0013] O padrão ouro atual para o tratamento da meningoencefalite causada por *Cryptococcus* spp é a combinação do poliênico anfotericina B (AmB) com 5-flucitosina. A AmB apresenta nefrotoxicidade acentuada e requer administração intravenosa, o que limita seu uso em regiões sem

infraestrutura médica adequada. Estima-se que um tratamento intravenoso de 15 dias com AmB lipossomal custe entre € 10.000 e € 20.000, na Europa (21) e no Brasil, esse valor pode atingir um custo mensal de R\$250.000,00 por paciente (Fonte: Centro Colaborador do SUS para Avaliação de Tecnologias e Excelência em Saúde - CCATES).

[0014] Nesse sentido, a busca de alternativas que diminuam os efeitos adversos dos tratamentos antifúngicos, o uso de anticorpos monoclonais em modelos de infecções fúngicas é considerado altamente promissor, visto que pode se ligar com alta especificidade a antígenos expressos em fungos nos fluidos corporais do paciente, sendo ainda ferramentas-chave no campo de diagnóstico clínico.

[0015] O gênero *Cryptococcus* é caracterizado por células leveduriformes ovais ou esféricas circundadas por uma cápsula. Os membros do gênero são pertencentes ao filo Basidiomycota (22). *C. neoformans* e *C. gattii*, membros patogênicos do gênero, por décadas foram subdivididos em três variedades e cinco sorotipos baseados nos determinantes antigênicos do polissacarídeo capsular: *C. neoformans* var *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var *neoformans* (sorotipo D), *C. neoformans* (híbrido AD) e *C. gattii* (sorotipos B e C) (23). Atualmente, há em curso uma proposta de reclassificação de *C. neoformans* e *C. gattii* em sete espécies, com base em evidências moleculares (24).

[0016] *C. neoformans* é um fungo saprófito, cosmopolita, globalmente distribuído e encontrado em excrementos de pássaros (comumente pombos), no solo e em árvores. Trata-se do causador da criptococose predominantemente em indivíduos imunossuprimidos. *C. gattii* é encontrado em troncos de árvores de regiões tropicais e subtropicais causando a infecção, principalmente, em imunocompetentes (25).

[0017] O balanço entre sistema imune do hospedeiro e a virulência do fungo está diretamente relacionado com o desenvolvimento ou não da doença.

Cabe destacar, que o estabelecimento da infecção se dá pela exposição do homem aos ambientes contaminados pelo fungo, visto que há similaridade entre os isolados clínicos e ambientais em indivíduos acometidos pela criptococose (26).

[0018] A criptococose humana ocorre primariamente através inalação de células de levedura dessecadas, ou possivelmente basidiósporos, que são depositadas no espaço alveolar (Figura 1). A virulência da cepa infecciosa, o tamanho do inóculo e o estado imunológico do indivíduo são fatores preponderantes para o progresso da doença (27).

[0019] A infecção pode ser assintomática ou assumir uma forma latente, dependendo do sistema imune do hospedeiro. Em contraste, em indivíduos imunocomprometidos, as células criptocócicas proliferam e se disseminam para diversos órgãos, com predileção pelo cérebro. Nessas condições, são comuns os quadros de meningoencefalite (28).

[0020] Cabe ressaltar que a interação entre *C. neoformans* e predadores ambientais é vista como um fator importante para a evolução do fungo como um patógeno intracelular facultativo bem-sucedido. *C. neoformans* pode sobreviver em amebas e pode utilizar a mesma estratégia patogênica em macrófagos humanos, que em vários aspectos fornecem um ambiente similar. Desta forma, foi proposto que tal predação no nicho ambiental tenha selecionado as características de virulência criptocócica que contribuem para a patogênese em hospedeiros humanos (29).

[0021] As células fagocíticas são a primeira linha de defesa do organismo contra fungos patogênicos. As interações entre *Cryptococcus* e fagócitos podem resultar em controle da infecção, dependendo de vários fatores estimulatórios. Entretanto, fagócitos pode promover um maior risco para infecção fúngica disseminada, uma vez que podem carrear fungos vivos entre tecidos distintos. O estado imunológico do indivíduo está diretamente ligado ao destino dessa interação. Indivíduos imunocompetentes em geral

bloqueiam a disseminação fúngica através de mecanismos celulares locais. Pacientes imunocomprometidos produzem uma resposta inflamatória favorável à replicação do patógeno (30,31), com consequente disseminação.

[0022] A progressão da doença é diretamente relacionada aos perfis Th1 e Th2 e consequente polarização de macrófagos M1/M2. (32). Células do tipo Th1 produzem grandes quantidades de TNF e $\text{INF}\gamma$, que induzem a ativação de macrófagos do tipo M1 e consequente eliminação do *Cryptococcus* (33). Células do tipo Th2 produzem citocinas envolvidas em reações inflamatórias induzindo a proliferação de macrófagos do tipo M2, que não apresentam atividade antifúngica e permitem a proliferação do fungo (30).

[0023] Cabe ressaltar que existem diversas moléculas produzidas por *Cryptococcus* que estimulam a resposta de macrófagos do tipo M2 (34,35). Dentre essas, destacam-se arginase, urease e lacase (30). Estes macrófagos representam papel central na disseminação da criptococose, já que o *Cryptococcus* pode usar essas células como nicho de replicação e sair dos macrófagos através de exocitose não lítica, dentre outros mecanismos (14). Devido a essa característica, foi proposta uma hipótese de que os macrófagos poderiam atuar como “Cavalos de Tróia”, levando células internalizadas de *C. neoformans* a atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o Sistema Nervoso Central (SNC) (36).

[0024] A predileção do *C. neoformans* pelo SNC se correlaciona com diversos fatores. O SNC pode representar para o fungo um abrigo mais seguro, visto que a o cérebro consiste de ambiente imunologicamente privilegiado. Além disso, de L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA), um substrato difenólico utilizado pelo fungo para síntese de melanina, pode facilitar sua permanência no SNC.. A melanização de *C. neoformans* e *C. gattii* protege os fungos contra estresse oxidativo, fagocitose, diminui a ação de antifúngicos, e modifica padrões de imunidade (27).

[0025] O diagnóstico clínico de IFIs é difícil devido à falta de sinais e sintomas específicos no início da doença. Testes laboratoriais são, portanto, fundamentais para um desfecho que resulte na redução de morbidade e mortalidade.

[0026] As características ideais para o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico incluem detecção precoce do patógeno, boa sensibilidade, capacidade de obter discriminação em nível de espécie, detecção de uma ampla gama de patógenos (capacidade múltipla), confiabilidade, precisão quantitativa (capacidade de distinguir entre doença e colonização) e ser não invasiva. Nenhum dos testes diagnósticos padrão atende a todos esses critérios e, de fato, muitos estão ausentes em vários níveis.

[0027] A identificação de patógenos fúngicos ainda está baseada na visualização direta do organismo por microscopia óptica, histopatologia de tecidos infectados e no cultivo do fungo (17,37). Apesar da cultura fúngica clássica e técnicas de sorologia tradicionais serem relevantes e necessárias, se fazem necessárias detecção e identificação de fungos por técnicas moleculares (anticorpos e antígenos, PCR e sequenciamento) que possibilitem com rapidez e eficácia o diagnóstico, complementando os métodos tradicionais baseados na cultura.

[0028] Uma das maiores limitações do uso de cultura no diagnóstico de IFI está ligada ao tempo de obtenção de resultados, visto que vários patógenos, em especial os fungos filamentosos, têm crescimento lento. Dependendo das características do inóculo e do crescimento fúngico, a cultura requer pelo menos 2 a 3 dias de incubação e, para algumas espécies, dias a semanas. Culturas positivas de fontes não estéreis, incluindo espécimes de lavado bronco alveolar (BAL), também requerem interpretação cautelosa para diferenciar entre colonização fúngica e isolamento do verdadeiro agente invasivo. Finalmente, as hemoculturas fúngicas, embora não invasivas e

altamente específicas, requerem incubação prolongada e podem ser igualmente insensíveis, apresentando resultados confiáveis em 50% de casos ligados a *Candida* spp. e 10% de casos ligados a *Aspergillus* spp. (38).

[0029] No caso de meningites fúngicas, o problema pode ser ainda mais grave, pois um diagnóstico impreciso ou tardio pode decretar a morte do paciente. Cabe ressaltar que em alguns casos se faz necessária a biópsia para estabelecer um diagnóstico preciso, já que as culturas de líquido céfalo raquidiano são frequentemente não diagnosticadas, especialmente em casos com abscesso cerebral fúngico (39). Na criptococose, esses problemas podem ser facilmente contornados com o uso do teste CrAg (do inglês *Serum Cryptococcal Antigen*), que detecta antígeno fúngico no soro do paciente. Esse teste consiste de um método eficiente e barato para prevenção de morte em pessoas infectadas com HIV com contagens de linfócitos T CD4 $\leq 100/\mu\text{L}$ em regiões com restrições sócio-econômicas (40).

[0030] A biópsia geralmente não é uma opção viável para pacientes gravemente doentes e com suspeita de IFIs como a aspergilose, visto que apresentam uma maior probabilidade de apresentarem hemorragia devido a trombocitopenia (39). O teste apresenta sensibilidade e especificidade limitadas (41) e requer profissionais bem treinados para identificação do microrganismo. Apesar disso, a observação microscópica ainda se mantém como padrão ouro de diagnóstico para muitas IFIs (42).

[0031] A identificação de antígenos fúngicos em amostras de pacientes evoluiu substancialmente na área de diagnóstico de IFIs. Essas moléculas, em grande parte, incluem componentes da parede celular (Figura 2). A detecção dessas estruturas pode sugerir ocorrência de IFIs e, frequentemente, são detectáveis antes que sinais clínicos ou sintomas da doença estejam presentes (43). Dentre esses biomarcadores destacam-se (1, 3)- β -D-glucana (BDG), galactomanana de *Aspergillus* (GM), glucuronoxilomanana de *Cryptococcus* (GXM) e antígeno histoplasmínico.

[0032] Conforme mencionado acima, a detecção de antígenos permite identificar de forma precoce as IFIs, direcionar estratégias terapêuticas e avaliar o prognóstico da doença em resposta a terapia (38,45,46). BDG é encontrado na maioria dos fungos, com exceção de Zigomicetos, *Blastomyces dermatitidis*, *Mucoromycotina*, *Cryptococcus* spp. e alguns *Basidiomycota* (e.g., *Malassezia* spp.) (45).

[0033] Além da detecção de BDG possuir especificidade limitada para determinados patógenos fúngicos e variar de acordo com o organismo, há vantagens claras quando comparadas com outras técnicas. No caso da candidíase invasiva, há aumento da sensibilidade em aproximadamente 70% em comparação com a hemocultura (47). Em casos de pneumonia por *Pneumocystis*, são observadas maior sensibilidade (96%) e especificidade (84%) para BDG no soro quando comparadas a mesma análise em candidíase e arpergilose, as quais não ultrapassam 80% (48). Cabe destacar, que esses kits diagnósticos já estão disponíveis no mercado e usados para avaliar casos de pneumonia por *Pneumocystis* (Empresa *Era Biology - Goldstream Fungus (1-3)-β-D-Glucan Test (GCT-110T)* – Empresa *MiraVista Diagnostics – Beta-D Glucan Assay*).

[0034] Em contrapartida, o alto custo associado aos resultados falso-positivos em pacientes com bacteremia Gram Positiva e Negativa (37%) e em lotes de antibióticos β-lactâmicos (33%) mostrou que esse teste diagnóstico pode ser limitado, apesar de ser útil quando em combinação com outros métodos diagnósticos complementares (49).

[0035] Galactomanana (GM) é um polissacarídeo característico de *Aspergillus* spp liberado durante o crescimento sendo detectado por testes comercialmente disponíveis na circulação sanguínea, no soro, urina e BAL durante o crescimento do fungo no tecido (50). Por ser liberado pelo fungo constitutivamente, a GM pode ser um marcador de prognóstico e evolução da doença e/ou resposta ao tratamento. Diversos métodos imunoenzimáticos são

utilizados para detecção de GM, porém o mais promissor é o ELISA sanduíche por ser o mais sensível, detectando baixas concentrações de GM em amostras clínicas (51).

[0036] O teste de GM apresenta um resultado melhor de acordo com a população de pacientes, por exemplo em pacientes transplantados ou com doenças hematológicas, apresentando uma especificidade em torno de 90% quando utilizado através da detecção por líquido bronco-alveolar (43,52). Em pacientes pediátricos, o teste pode produzir falsos-positivos em torno de 80% dos casos, fato associado a aleitamento materno, bacteremia ou uso de antibióticos (43). Além disso, a GM apresenta reações cruzadas com antígenos de vários fungos, já que o polissacarídeo manana é encontrado na parede de diversos fungos.

[0037] No entanto, existem desafios associados a esses métodos, incluindo o risco de resultados falso-positivos devido à contaminação ou reatividade cruzada, bem como falso-negativos, devido à sensibilidade imperfeita do ensaio. Como regra geral, nenhum teste de diagnóstico laboratorial deve ser usado como um teste independente para o diagnóstico de IFI. Os testes atuais de diagnóstico fúngico devem ser usados em combinação com as avaliações do hospedeiro e as características radiográficas para gerenciar de maneira otimizada os pacientes em risco (43).

[0038] Durante a última década, ensaios de PCR emergiram como abordagens experimentais promissoras para detectar patógenos fúngicos. O uso de PCR é comum na prática clínica, com grande aplicação para orientar a terapia preventiva ou direcionada ao controle de patógenos (43,50,53).

[0039] Em fungos, a amplificação gênica por PCR comumente envolve regiões 18S, 5.8S e 28S, que codificam para RNA ribossômico (rRNA), e áreas variáveis da sequência de DNA de regiões intervenientes internas de espaçadores transcritos, denominadas ITS1 e ITS2 (54).

[0040] Além de PCR, uma variedade de métodos moleculares

incluindo sequenciamento de DNA, microarranjos e espectrometria de massa Ionização e dessorção a laser por espectrometria de massa por ionização (MALDI) vem usada para desenvolver ensaios de detecção molecular de ampla faixa (43). Entretanto, a abordagem mais comum para a detecção molecular é a PCR seguida do sequenciamento de Sanger, visto que pode ser particularmente útil quando a cultura fúngica é negativa ou não é solicitada no momento em que a biópsia tecidual foi realizada (55).

[0041] Nos últimos 30 anos, a importância dos fungos como causadores de doenças em humanos aumentou dramaticamente (18). Por outro lado, as opções terapêuticas disponíveis são inacessíveis, tóxicas ou ineficientes, o que torna inquestionável a importância da busca por novos antifúngicos (56).

[0042] Como anteriormente dito, atualmente, existem quatro classes principais de fármacos antifúngicos. Essas classes incluem os azóis, os polienos, análogos de pirimidinas e as equinocandinas. Várias outras classes, como morfolinas e alilaminas, são usadas apenas como agentes tópicos devido à baixa eficácia ou efeitos adversos graves quando administradas sistemicamente.

[0043] Os azóis são os antifúngicos mais utilizados na prática clínica. Esses fármacos apresentam como alvo a via biosintética do ergosterol, atuando principalmente através da inibição de uma enzima chave, a lanosterol 14 alfa desmetilase, codificada pelo gene *ERG11* (57).

[0044] O FLC e o itraconazol, azóis de amplo uso, desde a década de 90 vem sendo usados no tratamento de diversas infecções sistêmicas, devido ao seu alto poder de absorção e uma toxicidade menor que os azóis inicialmente desenvolvidos (58). Entretanto, apresentam interações medicamentosas com fármacos utilizados na quimioterapia ou no tratamento da AIDS (58,59). Além disso, itraconazol e FLC são ineficazes contra alguns patógenos emergentes como *Scedosporium*, *Fusarium* e *Mucorales* (60). É

ainda crescente a percepção de que o fenômeno de resistência fúngica aos azóis está em expansão (58). Outros fármacos dessa classe estão em desenvolvimento, como os triazóis de nova geração. Alguns já aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (57).

[0045] A classe dos polienos compreende mais de 200 moléculas, a maioria deles sendo produzidos pela bactéria *Streptomyces*, contudo, apenas três possuem aplicação clínica, a saber: AmB, nistatina e natamicina (58). Esses compostos se complexam com o ergosterol na membrana plasmática (57). Sua estrutura anfifílica lhes permite inserção na bicamada lipídica seguida da formação de poros. A formação de poros promove a desestabilização da membrana plasmática com consequente vazamento de componentes intracelulares, resultando em lise celular (61). Os polienos se ligam com menor afinidade ao colesterol, análogo humano do ergosterol. A ligação ao colesterol explica sua alta toxicidade e consequentes efeitos colaterais (62). Nesse sentido, a AmB é amplamente usada em infecções sistêmicas, ao contrário de nistatina e natamicina que, extremamente tóxicas, são usadas apenas topicamente em infecções do trato vaginal e cutâneas (63).

[0046] A AmB tem má absorção através do trato gastrointestinal, acarretando na necessidade de administração por via intravenosa associada a efeitos adversos severos, principalmente, nos rins e no fígado (64). Cabe ressaltar que efeitos colaterais como náusea, vômitos e febre são comuns, mas o efeito mais grave é a nefrotoxicidade (65). Novas formulações de AmB, como os complexos lipossômicos de AmB, minimizam esses efeitos colaterais, porém elevam o custo do fármaco (66,67).

[0047] As fluoropirimidinas são análogos sintéticos estruturais de citocina e por consequência inibem a síntese ácidos nucleicos (68). Entretanto, esses fármacos não são utilizados de forma isolada, devido ao relato de mecanismos resistência (69). O padrão ouro atual para o tratamento da meningoencefalite por *Cryptococcus* é a combinação da AmB com 5-

flucitosina (5-FC), visto que minimiza a nefrotoxicidade da AmB por conta da administração de doses mais baixas do fármaco por um menor período de tempo, além de reduzir o desenvolvimento de resistência à 5-FC (64). Ressalta-se que a 5-FC não está disponível no Brasil, o que limita o acesso de pacientes brasileiros ao tratamento ideal.

[0048] As equinocandinas são inibidores não competitivos da β (1-3) - glucana sintase, uma enzima que catalisa a polimerização da uridina difosfato-glicose em β (1-3) glucana, um dos componentes estruturais responsáveis pela manutenção da integridade da parede celular em fungos (70). A inibição da β (1-3) - glucana sintase leva à desestabilização da parede celular e ao extravasamento de componentes intracelulares, resultando em lise celular (71,72) . Porém, vários patógenos fúngicos são parcialmente ou totalmente resistentes à ação das equinocandinas, incluindo *C. neoformans* e *C. gattii* ou espécies pertencentes aos gêneros *Trichophyton* e *Fusarium*, além de *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans* e *Cladophialophora bantiana* (58). No entanto, as equinocandinas constituem uma boa alternativa para combater as demais infecções fúngicas. A maioria dos tratamentos com falha na terapia clássica com azólicos ou polienos se utiliza com sucesso das equinocandinas.

[0049] Os mecanismos de resistência antifúngica podem incluir a diminuição da concentração eficaz do fármaco, alterações ou superexpressão dos alvos dos fármacos e desvios metabólicos (57).

[0050] Anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas secretadas por células B que apresentam a capacidade de identificar e/ou neutralizar organismos ou antígenos estranhos ao sistema imune do hospedeiro (73). As Ig são formadas por duas cadeias proteicas pesadas e duas cadeias leves, as quais possuem regiões variáveis que participam do reconhecimento de antígenos e as regiões constantes que exercem a função efetora da molécula (73).

[0051] A diversidade dos anticorpos se dá pela variabilidade nas sequências de aminoácidos da região variável das cadeias leve e pesada. As regiões determinantes de complementaridade (CDR) consistem de sequências hipervariáveis que entram em contato direto com o antígeno a ser reconhecido (73).

[0052] Os anticorpos podem ser divididos em classes e subclasses distintas, os denominados isotipos (73). As classes de Ig são IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, com subdivisão em humanos dos isotipos IgA e IgG em IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, cada um exercendo funções efetoras diferentes (73).

[0053] Os anticorpos monoclonais (AcM) foram desenvolvidos pela primeira vez em 1975 por Georges Köhler e César Milstein (74) através da produção de célula híbrida, denominada hibridoma, resultante da fusão de duas células diferentes (74). O hibridoma decorre da fusão de um linfócito B (previamente imunizado com o antígeno de interesse) com células de mieloma, gerando uma célula imortal e produtora de AcM (Figura 4).

[0054] Os AcM apresentam diversas aplicações nos campos de diagnóstico e terapia, podendo ser usados não apenas para doenças infecciosas causadas por bactérias, vírus e protozoários, mas também para doenças autoimunes e tumores, considerando suas altas sensibilidade e especificidade (75). Nos últimos 30 anos, cerca de 80 AcM foram aprovados pelo FDA para tratamento de diversas doenças, incluindo câncer, doenças inflamatórias crônicas, doenças neurodegenerativas e doenças infecciosas (76).

[0055] O imunodiagnóstico de doenças infecciosas melhorou significativamente após o advento da tecnologia de hibridomas, visto que os AcMs superam as limitações dos anticorpos policlonais, sendo os AcMs capazes de proporcionar a identificação de apenas um antígeno gerando resultados reprodutíveis e consistentes (77).

[0056] A utilização de AcM contra fungos patogênicos vem sendo cada vez mais frequente. Anticorpos com potencial terapêutico foram desenvolvidos contra antígenos como histona 2B de *H. capsulatum* (78), β -glucanas de *C. albicans* (79), glicosilceramida de *C. neoformans* (80), melanina de vários patógenos (81), e proteínas de choque térmico de *H. capsulatum* (82). Anticorpos com uso diagnóstico incluem aqueles reativos contra os antígeno M e H de *H. capsulatum* e contra o antígeno de *Cryptococcus* (CrAg) (83,84).

[0057] A administração de AcM no tratamento de IFI depende de diversos fatores, que incluem, necessariamente, o isotipo do AcM, seu título, apresentação via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e, especialmente, a ativação de células imunes (85).

[0058] Os AcMs contra fungos podem mediar três efeitos diferentes: proteção (inibindo crescimento, imunomodulando a resposta do sistema imune e neutralizando os efeitos do fungo no tecido do hospedeiro), aumento da doença (por facilitar a disseminação da doença, por exemplo, favorecendo a fagocitose de *C. neoformans*) e neutralização de virulência (através da inibição da liberação de proteínas ou polissacarídeos fúngicos) (77). Esses efeitos estão ilustrados na Figura 5.

[0059] Os AcMs podem ainda agir de forma indireta na proteção contra IFI, através de promoção de fagocitose, ativação do sistema complemento, regulação de citotoxicidade celular, e maturação do fagossomo (86). Podem ainda afetar de forma direta como na formação de biofilme (87), liberação de polissacarídeos (88), dimorfismo (89), expressão gênica (90) e transdução de sinal (86).

[0060] Estudos imunoterapêuticos caracterizaram AcM protetores contra diversos alvos e diferentes espécies fúngicas como: β -1,3 Glucana - *A. fumigatus* (91), Als3 - *C. albicans* (92), *heat-shock protein 60* - *H. capsulatum* (93), GXM - *C. neoformans* (94), gp43 - *P. brasiliensis* (95) e

p55 - *Pneumocystis* spp (96). Esses estudos demonstraram que alguns antígenos fúngicos induzem a proteção mediada por anticorpos durante infecções fúngica.

[0061] Alguns desses alvos antigênicos por serem conservados são aplicados a diferentes fungos. Diante desse cenário, a quitina, um polímero de *N*-acetilglucosamina, por ser um dos principais constituintes da parede celular fúngica, se torna um excelente alvo para novas estratégias terapêuticas.

[0062] Neste sentido, as infecções fúngicas tornaram-se uma das principais causas de doenças em indivíduos imunocomprometidos, constituindo um sério e subestimado problema de saúde pública (16), bem como o fenômeno da resistência a drogas está levando ao aumento significativo na morbidade e mortalidade de indivíduos imunocomprometidos ao redor do mundo.

[0063] Sendo assim, a busca de alternativas que diminuam os efeitos adversos dos tratamentos antifúngicos, o uso de anticorpos monoclonais em modelos de infecções fúngicas é considerado altamente promissor, visto que pode se ligar com alta especificidade a antígenos expressos em fungos nos fluidos corporais do paciente, sendo ainda ferramentas-chave no campo de diagnóstico clínico.

[0064] Ademais, técnicas eficientes de diagnóstico podem ajudar a identificar pacientes com IFIs mais cedo do que apenas com a cultura celular. No entanto, existem desafios associados a esses métodos, incluindo o risco de resultados falso-positivos devido a contaminação ou reatividade cruzada, bem como falso-negativos devido à sensibilidade imperfeita do ensaio. É desejável, portanto, a combinação de testes diferentes em associação com avaliações do hospedeiro, incluindo características intrínsecas de pacientes sob risco.

[0065] Diante desse cenário e devido à grande complexidade da arquitetura da superfície celular dos fungos, foram escolhidos

quitoooligômeros como alvos para o desenvolvimento dos AcM.

[0066] Portanto, a presente invenção revela AcM contra oligômeros de quitina para uso terapêutico e de diagnóstico de fungos em amostras biológicas. Ademais, a presente invenção revela ainda que sinergismo dos AcM desenvolvidos com AmB, devido o ligação a quitoooligômeros em modelo murino de infecção por *Cryptococcus neoformans*, levou a um aumento da sobrevivência dos indivíduos infectados.

[0067] As vantagens da invenção serão evidentes na descrição da invenção fornecida neste documento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0068] A presente invenção tem por objetivo prover anticorpos monoclonais (AcMs) para o tratamento de infecções fúngicas e diagnóstico de infecções fúngicas.

[0069] Particularmente, os AcMs são desenvolvidos para apresentarem atividade contra quitoooligômeros fúngicos.

[0070] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê anticorpo monoclonal que compreende:

(i) uma sequência VH CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 1, VH CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 2 e VH CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 3; e (ii) uma sequência VL CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 4, VL CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 5 e VL CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 6; ou

(i) uma sequência VH CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 7, VH CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 8 e VH CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 9; e (ii) uma sequência VL CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 10, VL CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 11 e VL CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 12.

[0071] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê uma composição farmacêutica que compreende o referido anticorpo monoclonal.

A composição farmacêutica pode ainda compreender AmB e/ou FLC, bem como um veículo/excipientes farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica é para uso no tratamento de infecções fúngicas.

[0072] Em um terceiro aspecto, a presente invenção provê o uso do anticorpo monoclonal na preparação de um medicamento para tratar infecções fúngicas. Em que o referido uso pode ser em combinação com polienos e/ ou azóis preferencialmente, preferencialmente, AmB e/ou FLC.

[0073] Em um quarto aspecto, a presente invenção provê um método de diagnóstico de infecções fúngicas que compreende:

(i) prover o referido anticorpo monoclonal ou a referida composição com uma amostra obtida de um indivíduo,

(ii) contatar o referido anticorpo monoclonal ou a referida composição com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para a formação de complexos antígeno/anticorpo; e

(iii) detectar o complexo antígeno/anticorpo formado na etapa anterior através de uma técnica de detecção capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/anticorpo. A amostra biológica é selecionada do grupo compreendendo saliva, urina, soro, sangue, lavado bronco-alveolar, líquor ou líquido peritoneal, ou quaisquer outros fluídos biológicos do indivíduo.

[0074] Em um quinto aspecto, a presente invenção provê um kit de diagnóstico de infecções fúngicas que compreende o referido anticorpo monoclonal ou a referida composição. O kit pode compreender ainda instruções de uso. Ademais, o kit pode compreender um meio de detecção do complexo antígeno/anticorpo, o qual pode compreender um gerador de sinal, capaz de gerar um sinal detectável.

[0075] Em um sexto aspecto, a presente invenção provê um kit para tratamento de infecções fúngicas, caracterizado pelo fato de que compreende

(i) o referido anticorpo monoclonal ou a referida composição;

e

(ii) agente antifúngico,

(iii) Instruções para uso dos componentes em combinação.

[0076] Em um sétimo aspecto, a presente invenção provê um método para o tratamento de infecções fúngicas compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do referido anticorpo ou da referida composição em um indivíduo.

[0077] Em um oitavo aspecto, a presente invenção provê um anticorpo ou uma composição farmacêutica para uso no tratamento de infecções fúngicas em um indivíduo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0078] A Figura 1 se refere a ciclo de infecção de *Cryptococcus spp.* O fungo pode sobreviver em solos e árvores, além de infectar diversos animais, dentre eles os pombos que são veículos de dispersão das células fúngicas. Em humanos, através da inalação de esporos ou leveduras dessecadas presentes no ambiente, é estabelecida uma infecção pulmonar, que pode evoluir para enfermidades no sistema nervoso central (SNC). (Modificado de [28]).

[0079] A Figura 2 se refere a representação esquemática da estrutura da parede celular e cápsula dos fungos (Modificado [99]).

[0080] A Figura 3 se refere ação das quatro classes principais de fármacos antifúngicos. A ilustração demonstra a ação das quatro classes principais de antifúngicos. Flucitossina mostra sua ação na síntese de ácidos nucleicos, enquanto as outras classes têm seu sítio de ação na membrana plasmática ou parede celular, seja na síntese ou se complexando ao ergosterol (Azóis e AmB, respectivamente) ou na síntese de β -Glucana Sintase (Equinocandina). (Modificado de [100]).

[0081] A Figura 4 se refere ao desenvolvimento de AcM através da técnica de hibridoma. Linfócitos B fusionados com células de mieloma

murino geram hibridomas, que são células imortais produtoras de anticorpos, que posteriormente são selecionados por técnicas de imunoenensaio para eleger o melhor clone produtor do AcM em estudo. Figura adaptada de Abbas, A. et al 2015 [073].

[0082] A Figura 5 se refere aos mecanismos propostos de ação de anticorpos contra fungos, os quais podem ser considerados em três categorias gerais envolvendo: A) inibição direta do crescimento, B) neutralização dos efeitos indesejáveis dos produtos fúngicos nos tecidos do hospedeiro e C) imunomodulação e potenciação dos mecanismos imunes inatos, que no caso de *C. neoformans* não são protetores.

[0083] A Figura 6 se refere curva da última titulação dos anticorpos encontrados no soro dos animais através de ELISA. (A) Título do soro para Imunoglobulina M (IgM); (B) Título do Soro para IgG. As curvas em vermelho, azul e verde representam animais distintos. Linha tracejada representa a linha de corte do soro pré-imune.

[0084] A Figura 7 se refere à isotipagem dos hibridomas AF1/CC5 e HC6/DD11. Foram realizados testes para cada um dos isotipos especificados acima, com positividade predominante para detecção de IgM.

[0085] A Figura 8 se refere à análise da purificação do AcM AF1/CC5 e HC6/DD11. Raia 1: Padrão de peso molecular Precision Dual Color (Bio-Rad); Raias 2 e 3: AcM AF1/CC5 e HC6/DD11, respectivamente; Raia 4: Padrão de peso molecular Precision Dual Color (Bio-Rad). As bandas predominantes nas frações 2 e 3 correspondem às cadeias pesadas (~70kDa) e leves (massa molecular variando entre ~23-24kDa) de IgM.

[0086] A Figura 9 se refere à curva de saturação da ligação AcM e *C. albicans*.

[0087] A Figura 10 se refere à curva de saturação de ELISA para *C. neoformans* e *C. albicans* detectável pelo AcM HC6/DD11 e AF1/CC5. Em verde temos *C. neoformans* e em azul *C. albicans*.

[0088] A Figura 11 se refere à curva de saturação de Dot Blot para *C. neoformans* e *C. albicans* detectável pelo AcM HC6/DD11 e AF1/CC5.

[0089] A Figura 12 se refere à análise por IF da reação dos AcM HC6/DD11 e AF1/CC5 com *C. albicans*. Os painéis a esquerda mostram as células fúngicas através de contraste diferencial, enquanto os outros painéis mostram as células em modo de fluorescência. As setas indicam a marcação polar característica desse tipo de alvo fúngico, aos quais foram demonstradas para ambos os AcM, sendo identificada inclusive na imagem em sobreposição (Calcofluor / Alexa 548).

[0090] A Figura 13 se refere ao ensaio de melanização. (A) Análise visual da pigmentação após crescimento de fungos em meio líquido suplementado com L-DOPA e tratado com os AcM.; B e C) Representação gráfica por densitometria relativa da pigmentação. O AcM HC6/DD11 apresentou inibição parcial da pigmentação até a concentração de 6,2 μ g/ml ($p < 0,05$), enquanto o AcM AF1/CC5 apresentou inibição total até a concentração de 6,2 μ g/ml ($p < 0,001$) e parcial nas concentrações de 3,2 e 1,6 μ g/ml ($p < 0,05$).

[0091] A Figura 14 se refere ao ensaio de XTT – formação de Biofilme. A formação de biofilme foi medida indiretamente pelo ensaio de redução de XTT. O tratamento dos fungos com AcM HC6/DD11 e AF1/CC5 reduziram a formação de biofilme de forma significativa quando comparadas ao fungo sem tratamento ($p < 0,05$). Barra preta fungos sem tratamento e barra branco fungo tratado. A e B células lavadas; C e D células não lavadas.

[0092] A figura 15 se refere ao ensaio de XTT – formação de Biofilme. A formação de biofilme foi medida indiretamente pelo ensaio de redução de XTT. O tratamento do fungo H99 com AcM HC6/DD11 e AF1/CC5 reduziram a formação de biofilme de forma significativa quando comparadas ao fungo sem tratamento e apresentaram comportamento semelhante ao fungo tratado com anticorpo 18B7 ($p < 0,05$). Barra preta

fungos sem tratamento e barra branco fungo tratado. A e B células lavadas; C e D células não lavadas.

[0093] A Figura 16 se refere ao ELISA contra células integras de *C. neoformans*, *Giardia lamblia*, linhagem A549, *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Em azul temos *C. neoformans*, em laranja (quadrado) *Giardia lamblia*, em verde (triângulo) linhagem A549, em lilás (triângulo invertido) *E. coli* e em preto (losango) *Staphylococcus aureus*. Linha tracejada representa o branco da reação.

[0094] A Figura 17 se refere ao sensograma representativo demonstrando as interações de ambos AcM contra quitotriose. (A) AcM HC6/DD11 e (B) AF1/CC5. Em verde a concentração de quitotriose de 0,06M e em vermelho de 0,1M.

[0095] A Figura 18 se refere (A e B) à representação do efeito sinérgico fungicida dos AcM HC6/DD11 e AF1/CC5 somado a AmB 0,1 µg/ml a partir da concentração de 6,2 µg/ml somado a 0,1 µg/ml de AmB comparado a AmB de forma isolada na concentração de 1 µg/ml ($p < 0,001$). A) Efeito sinérgico parcial potencializado do AcM nas concentrações de 1,6 e 3,2 µg/ml quando comparado com a AmB isolada na concentração de 0,1 µg/ml ($p < 0,01$); B) Efeito sinérgico parcial potencializado do AcM na concentração de 3,2 µg/ml quando comparado com a AmB isolada na concentração de 0,1 µg/ml ($p < 0,01$).

[0096] A Figura 19 se refere (A e B) à representação do efeito sinérgico dos AcM HC6/DD11 e AF1/CC5 somado ao FLC. Efeito sinérgico fungicida parcial potencializado do HC6/DD11 e AF1/CC5 a partir da concentração de 3,2 µg/ml somado a 4 µg/ml de FLC quando comparado ao FLC de forma isolada na concentração de 4 µg/ml ($p < 0,01$). Ambos os AcM apresentaram potencialização do efeito fungicida parcial quando somado ao FLC a 2 µg/ml, tendo seu comportamento similar ao FLC na concentração de 4 µg/ml de forma isolada.

[0097] A Figura 20 se refere à administração de AcM somado a AmB é protetor no modelo de infecção por *C. neoformans*. Curva de sobrevivência comparando animais tratados com PBS, AcM, AmB (0,25mg/kg) e grupo sinérgico. Os grupos com tratamento isolado vieram a óbito entre 28 e 37 dias, enquanto o grupo sinérgico apresentou 100% de sobrevida e teve significância estatística quando comparados aos outros grupos ($p \leq 0.01$) ($n=7$).

[0098] A Figura 21 se refere ao fragmento scFv dos anticorpos murinos e humanizados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0099] A não ser que sejam definidos de maneira diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado entendido por um técnico no assunto ao qual a invenção pertence. A terminologia utilizada na descrição da invenção tem finalidade de descrever concretizações particulares somente, e não tem a intenção de limitar o escopo dos ensinamentos. A não ser que seja indicado de forma diferente, todos os números expressando quantidades, porcentagens e proporções, e outros valores numéricos usados no relatório descritivo e nas reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados, em todos os casos, pelo termo “cerca de”. Assim, a não ser que seja indicado o contrário, os parâmetros numéricos mostrados no relatório descritivo e nas reivindicações são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades a serem obtidas.

[00100] A prática da presente invenção irá empregar, a menos que indicado de forma diferente, métodos convencionais de química, bioquímica, técnicas de DNA recombinante e imunologia, dentro do conhecimento da técnica. Tais técnicas são explicadas completamente na literatura. Veja, por exemplo, Fundamental Virology, 2ª Edição, vols. I & II (B.N. Fields e D. M. Knipe, eds.); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir e C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, Proteins: Structures e Molecular Properties (W.H. Freeman e

Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., edição atual); Sambrook, e cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edição, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick e N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

[00101] Conforme empregado ao longo do presente pedido, o termo “aminoácido” denota o grupo α -aminoácidos que diretamente ou na forma de um precursor pode ser codificado por um ácido nucleico. Os aminoácidos individuais são codificados por ácidos nucleicos consistindo de três nucleotídeos, conhecidos como códons. Cada aminoácido é codificado por pelo menos um códon. O fato do mesmo aminoácido ser codificado por diferentes códons é conhecido como “degeneração do código genético”. O termo “aminoácido”, como usado no presente pedido, denota os α -aminoácidos que ocorrem naturalmente, compreendendo alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina.

[00102] Os termos “peptídeo”, “polipeptídeo” ou “proteína” podem ser utilizados intercambiavelmente, e fazem referência a um polímero de aminoácidos conectado por ligações peptídicas, independentemente do número de resíduos de aminoácido que constituem esta cadeia. Os polipeptídeos, como aqui usados, incluem “variantes” ou “derivados” dos mesmos, que se referem a um polipeptídeo que inclui variações ou modificações, por exemplo, substituição, deleção, adição ou modificações químicas em sua sequência de aminoácido em relação ao polipeptídeo de referência. Exemplos de modificações químicas são glicosilação, PEGilação, PEG alquilação, alquilação, fosforilação, acetilação, amidação, etc. O polipeptídeo pode ser produzido artificialmente a partir de sequências nucleotídicas clonadas através da técnica de DNA recombinante ou pode ser preparado através de uma reação de síntese química conhecida.

[00103] Mais especificamente, o termo polipeptídeo da presente invenção pode também ser entendido como antígeno, poliantígeno ou antígeno multiepítopo, que consistem em uma junção de epítopos diferentes que podem ou não estar interligados por ligantes (*linkers*) flexíveis ou rígidos, específicos para um único patógeno ou para patógenos diferentes.

[00104] Em uma primeira concretização, a presente invenção fornece AcMs murino contra oligômeros de quitina ou quito oligômeros produzido através da tecnologia de hibridoma.

[00105] O termo “anticorpo” é qualquer imunoglobulina, incluindo anticorpos e seus fragmentos, que se liga em um epítopo específico. O termo inclui anticorpos policlonais, monoclonais, e quiméricos, os últimos mencionados descritos com mais detalhe em Patentes U.S. de Nos. 4.816.397 e 4.816.567. O termo "anticorpo(s)" inclui uma molécula de imunoglobulina (Ig) de tipo selvagem, geralmente compreendendo quatro cadeias de polipeptídeo de comprimento total, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L), ou um seu homólogo de Ig equivalente (e.g., um nanocorpo de camélídeo, que compreende apenas uma cadeia pesada); incluindo seus mutantes, variantes ou derivados funcionais de comprimento total, que mantêm as características de ligação em epítopo essenciais de uma molécula de Ig, e incluindo anticorpos de domínio dual específico, biespecífico, multiespecífico, e variável dual; moléculas de Imunoglobulina podem ser de qualquer classe (e.g., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), ou subclasse (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2). Também está incluído dentro do significado do termo “anticorpo” qualquer “fragmento de anticorpo”.

[00106] O termo “anticorpo monoclonal” é amplamente reconhecido no campo técnico e se refere a um anticorpo que é produzido em massa no laboratório a partir de um único clone e que reconhece apenas um antígeno. Anticorpos monoclonais tipicamente são preparados fundindo uma célula B produtora de anticorpo com uma célula de crescimento rápido, tal como uma

célula tumoral (também conhecida como célula “imortal”). A célula híbrida resultante, ou hibridoma, é um clone capaz de produzir anticorpo indefinidamente, caso em condições normais de cultivo..

[00107] O termo “hibridoma” também é tradicionalmente reconhecido no campo técnico e é entendido por qualquer técnico no assunto com conhecimentos gerais como se referindo a uma célula produzida pela fusão de uma célula produtora de anticorpo e uma célula imortal, por exemplo, uma célula de mieloma. Esta célula híbrida é capaz de fornecer continuamente anticorpo.

[00108] O termo “antígeno” se refere a uma entidade ou fragmento desta que pode induzir uma resposta imune em um organismo, particularmente um animal, mais particularmente um mamífero incluindo um humano. O termo inclui imunógeno e regiões responsáveis por antigenicidade ou determinantes antigênicos.

[00109] Os antígenos fúngicos utilizados na presente invenção podem ser selecionados a partir de componentes de parede celular fúngica e seus oligômeros. Mais especificamente, os antígenos podem ser selecionados a partir de quitobiase, quitotriose, quitotetraose, quitopentaose, quitohexaose e quitoheptaose, e qualquer outro antígeno fúngico que tenha sua origem a quitina e seus oligômeros e sejam capazes de induzir uma resposta imune. Mais preferivelmente, o antígeno fúngico é quitotriose.

[00110] Os antígenos fúngicos da presente invenção podem ser obtidos a partir de qualquer espécie do reino Fungi., mais especificamente qualquer espécie dos filos Ascomicota, Basidiomicota, Zigomicota e Quitridiomicota. Ainda mais especificamente dos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e *Pneumocystis*. Neste sentido, as espécies podem ser selecionadas do grupo compreendendo *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Candida sp.*, *Aspergillus sp.*, *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis*.

[00111] Ademais, os antígenos podem ser combinados com adjuvantes

capazes de induzir uma resposta imune.

[00112] Adjuvantes são compostos que quando administrados em conjunto com um antígeno aumentam a resposta imune ao antígeno, entretanto quando administrados isoladamente não geram uma resposta imune ao antígeno. Os adjuvantes podem aumentar a resposta imune por vários mecanismos, incluindo recrutamento de linfócitos, estimulação de células B e / ou T e estimulação de macrófagos.

[00113] Adjuvantes adequados para a presente invenção podem ser selecionados, mas não estando limitados, das seguintes classes de compostos: (i) sais de alumínio (alúmen), como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio. Tais adjuvantes podem ser utilizados com ou sem outros agentes imunoestimulantes específicos, como MPL ou 3-DMP, QS21, aminoácidos poliméricos ou monoméricos, como ácido poliglutâmico ou polilisina; (ii) formulações de emulsão de óleo em água, tais como (a) MF59 (WO 90/14837), contendo 5% de esqualeno, 0,5% de Tween 80 e 0,5% de Span 85 (opcionalmente contendo várias quantidades de MTP-PE) formulados em partículas submicrônicas usando um microfluidizador, como o microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton Mass.), (B) SAF, contendo 10% de esqualano, 0,4% de polímero L121 bloqueado por plurínico de Tween 80,5% e thr-MDP, microfluidizado em uma emulsão submicrônica ou agitado em vórtex para gerar uma emulsão de tamanho de partícula maior, e (c) sistema adjuvante RibitTM (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.) contendo esqualeno a 2%, Tween 80 a 0,2% e um ou mais componentes da parede celular bacteriana do grupo que consiste em monofosforilípido A (MPL), trealose dimicolato (TDM) e esqueleto da parede celular (CWS), de preferência MPL + CWS (DetoxTM); (iii) adjuvantes de saponina, tal como Stimulons (QS21, Aquila, Worcester, Mass.) ou partículas geradas a partir deles, como ISCOMs (complexos imunoestimulantes) e ISCOMATRIX; (iv) Adjuvante Completo de Freund (CFA) e Adjuvante Incompleto de Freund

(IFA); (v) citocinas, como interleucinas, por exemplo, IL-1, IL-2 e IL-12, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e / ou quimiocinas como CXCL10 e CCL5. Preferencialmente, o adjuvante utilizado é hidróxido de alumínio (Al(OH)₃).

[00114] Originalmente desenvolvida por Köhler e Milstein [075], na metodologia do hibridoma, camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, é imunizado para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente à proteína usada para imunização.

[00115] Após a imunização, células produtoras de anticorpos (linfócitos do baço) são fusionadas com células de mieloma (células malignas de tumores primários da medula óssea), criando linhagem celular híbrida, resultante de um único híbrido celular fundido (chamado hibridoma) que herdou certas características das linhagens celulares de linfócitos e mieloma. O agente de fusão apropriado pode ser o polietilenoglicol.

[00116] As células de hibridoma preparadas dessa maneira são cultivadas em um meio de cultura apropriado, que preferencialmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência de células de mieloma parental não fundidas. Por exemplo, na falta da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura selecionado para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

[00117] Os hibridomas secretam um único tipo de imunoglobulina específica para o antígeno; além disso, como as células do mieloma, as células híbridas tinham potencial para divisão celular indefinida. A combinação dessas duas características fornece vantagens distintas sobre os anti-soros convencionais. Enquanto os anti-soros derivados de animais vacinados são misturas variáveis de anticorpos policlonais que nunca podem ser

reproduzidos de forma idêntica, os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas altamente específicas de um único tipo.

[00118] O único tipo de imunoglobulina secretada por um hibridoma (anticorpo monoclonal) é específico para apenas um determinante antigênico, ou epítopo, no antígeno, uma molécula complexa com uma multiplicidade de determinantes antigênicos.

[00119] O meio de cultura em que as células de hibridoma são cultivadas é testado para determinar a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. De preferência, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por ensaio de ligação *in vitro*, como imunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA).

[00120] Após a identificação de células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitantes e cultivados por métodos padrão (98). Os meios adequados para esse fim incluem, por exemplo, meios D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascites de animais, por exemplo, por injeção intraperitoneal das células em camundongos.

[00121] Os anticorpos monoclonais produzidos por hibridoma são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro por procedimentos padrão de purificação de anticorpos, como cromatografia de afinidade (usando, por exemplo, proteína A ou proteína G-Sefarose) ou cromatografia de troca. íons, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise, entre outros.

[00122] Neste contexto, foram desenvolvidas diversas linhagens celulares de mieloma especializadas para produção de hibridomas, como por exemplo as linhagens amplamente conhecidas no estado da técnica: X63-Ag8, NSI-Ag4/1, MPCII-45.6TG1.7, C63-Ag8.653, Sp2/0-Ag14, FO e

S194/5XXO. BU.1, 210. RCY3.Agl.2.3, U-226AR, GM1500GTGAL2, U-226AR e GM1500GTGAL2. Mais especificamente, a linhagem é SP2/0 (Sp2/0-Ag14 (ATCC® CRL-1581™)).

[00123] De forma geral, após a fusão das células, o produto obtido é cultivado em meios seletivos, por exemplo, meio HAT contendo hipoxantina, aminopterina e timidina.

[00124] O referido meio possibilita a proliferação de células híbridas e evita o crescimento de células de mieloma não fundidas que normalmente continuariam a se dividir indefinidamente.

[00125] As células de mieloma utilizadas são mutantes sem hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT) e, portanto, não podem utilizar a via de resgate. No híbrido sobrevivente, o linfócito B fornece informações genéticas para a produção dessa enzima. Como os próprios linfócitos B têm uma vida útil limitada em cultura (aproximadamente duas semanas), as únicas células que podem proliferar nos meios HAT são híbridos formados a partir de células do mieloma e do baço.

[00126] Visto que anticorpos podem ser modificados em numerosas maneiras, o termo “anticorpo” deve ser entendido como cobrindo qualquer molécula ou substância tendo um domínio de ligação com a especificidade exigida. Assim, este termo cobre fragmentos de anticorpo, derivados, equivalentes funcionais e homólogos de anticorpos, incluindo qualquer polipeptídeo compreendendo um domínio de ligação de imunoglobulina, seja natural seja total ou parcialmente sintético. Moléculas quiméricas compreendendo um domínio de ligação de imunoglobulina, ou equivalente, fusionado em outro polipeptídeo são conseqüentemente incluídas. Clonagem e expressão de anticorpos quiméricos são descritas em EP-A-0120694 e EP-A-0125023 e em Patentes U.S. de Nos. 4.816.397 e 4.816.567.

[00127] Tem sido mostrado que fragmentos de um anticorpo inteiro podem desempenhar a função de ligação de antígenos. Exemplos de

fragmentos de ligação são (i) o fragmento Fab consistindo de domínios VL, VH, CL e CHI; (ii) o fragmento Fd consistindo dos domínios VH e CHI; (iii) o fragmento Fv consistindo dos domínios VL e VH de um anticorpo único; (iv) o fragmento dAb [101] que consiste de um domínio VH; (v) regiões CDR isoladas; (vi) fragmentos $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados (vii) moléculas Fv de cadeia única (scFv), nas quais um domínio VH e um domínio VL estão ligados por um linker peptídico que permite que os dois domínios se associem para formarem um sítio de ligação de antígeno [102, 103] ; (viii) fragmentos de anticorpo multivalentes (dímeros, trímeros e/ou tetrâmeros de scFv [104] (ix) dímeros de Fv de cadeia única biespecíficos (PCT/US92/09965) e (x) "diacorpos", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por fusão de gene (WO94/13804; [105]).

[00128] A frase "molécula de anticorpo" em suas várias formas gramaticais como aqui usada contempla ambas uma molécula de imunoglobulina intacta e uma porção imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobulina.

[00129] As moléculas de anticorpo podem ser, por exemplo, moléculas de imunoglobulina intactas, moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas e aquelas porções de uma molécula de imunoglobulina que contém paratopo, incluindo aquelas porções conhecidas na técnica como Fab, Fab', $F(ab')_2$ e F(v), cujas porções são preferidas para uso nos métodos terapêuticos aqui descritos.

[00130] Porções Fab e $F(ab')_2$ de moléculas de anticorpo são preparadas por reação proteolítica de papaína e pepsina, respectivamente, em moléculas de anticorpo substancialmente intactas por métodos que são bem conhecidos. Veja por exemplo, Patente U.S. de No. 4.342.566 de Theofilopolous et al. Porções de molécula de anticorpo Fab' também são bem conhecidas e são produzidas a partir de porções $F(ab')_2$ seguido por redução

das ligações de dissulfeto ligando as duas porções de cadeia pesada como com mercapto-etanol, e seguido por alquilação do ao proteína-mercaptano resultante com um reagente tal como iodo-acetamida. Um anticorpo contendo moléculas de anticorpo intactas é aqui preferido.

[00131] À parte da técnica de hibridoma tradicional há numerosas outras técnicas bem conhecidas para preparar anticorpos monoclonais. Particularmente úteis são os métodos de preparar anticorpos totalmente de humano. Um método é tecnologia de exibição de fago que pode ser usada para selecionar uma variedade de anticorpos de humano ligando especificamente no antígeno usando métodos de enriquecimento por afinidade. Exibição de fago tem sido completamente descrita na literatura e a construção e a triagem de bibliotecas de exibição de fago são bem conhecidas na técnica, veja, e.g., [106, 107, 108, 109]. Anticorpos totalmente de humano também podem ser preparados por imunização de camundongos transgênicos trazendo porções grandes das cadeias pesada e leve de imunoglobulina de humano, com um imunógeno. Exemplos de tais camundongos são bem conhecidos na técnica, e. g., o Xenomouse® (Abgenix, Inc.) e o HuMAb-Mouse (Medarex, Inc.), veja também Patentes U. S. de No. 6.207.418, No. 6.150.584, No. 6.111.166, No. 6.075.181, No. 5.922.545, No. 5.545.806 e No. 5.569.825. Anticorpos podem ser preparados por técnicas padrão, e.g. técnicas de hibridoma padrão ou por exibição de fago.

[00132] Anticorpos monoclonais derivados por técnica de hibridoma a partir de espécie diferente de espécie humana, tal como camundongo, podem ser humanizados, o que significa que um anticorpo de não-humano geneticamente modificado para ser mais humano com o propósito de se evitar HAMA quando infundido em humanos. Os métodos de humanização de anticorpos são bem conhecidos na técnica, dentre os métodos mais comuns estão enxerto de região determinante de complementaridade (CDR) e modificação superficial (também conhecida como fornecimento de superfície

nova). Estes métodos têm sido extensivamente descritos na literatura e em patentes, veja e.g.; [110]; Patentes U.S. 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089. 5.859.205 e 6.797.492, cada uma aqui incorporada como referência.

[00133] Mais especificamente, os anticorpos da presente invenção compreendem as seguintes sequências nucleotídicas das suas cadeias leve e pesada; ou sequências possuindo 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com as mesmas; ou suas sequências degeneradas:

i) HC6/DD11

Sequência Nucleotídica da Cadeia Pesada (VH):

[00134] 3'ggcagggagcgggtgaccgtggtccctgcgccccagacatcgaagtaccagtagct
actaccgtagtaatcccttgcacagtagtacatggctgtgtcctcagacctcagactgtcattccaggtacagg
gtgttcttggcattctctctagagatggtgaatcggcccgccacagtgtctgcatagtagatactatatgccaaatt
actaatgaatgctaccactcaggccccctccctggagcctgtcgaaccacgccattccgtagtactgaaag
tgaatccagaggctgcacaggatagttccgggaccctccaggctgcactaagcctccccctgactcctccag
cttaactgaccggtcga5' (SEQ ID NO: 13)

Sequência Nucleotídica da Cadeia Leve (VL):

[00135] 5'gcaaccaattcctgcatctccaggggagaggtcaccataacctgcagtgccagctca
agtgttaagttacatgactggttccagcagaagccaggcacttctcccaaactctggatttatagcacatccaac
ctggcttctggagtcctgctcgttcagtggcagtggatctgggaccttactctctcacaatcagccgaatgg
aggctgaagatgctgccacttattactgccagcaaaggagtagttaccgctcacgttcggtgctgggaccaag
ctggagctgaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccctcgagacca3' (SEQ ID NO: 14)

[00136] Tradução das sequências e respectivos CDRs utilizando o método de definição por Kabat:

VH

[00137] STGQVKLEESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSDYGMA
WVRQAPGKGPEWVAFISNLAYSIIYADTVTGRFTISRENAKNTLYLE
MSSLRSEDAMYYCARDYYGSSYWYFDVWGAGTTVTAPC (SEQ ID
NO: 15)

VL

[00138] ATNSCISRGEVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWI
YSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPL
TFGAGTKLELKRADAAPTVSLET (SEQ ID NO: 16)

[00139] Mais especificamente, em que os CDRs compreendem as seguintes sequências: (i) uma sequência VH CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 1, VH CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 2 e VH CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 3; e (ii) uma sequência VL CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 4, VL CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 5 e VL CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 6 ou sequências possuindo 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com as mesmas.

i) AF1/CC5

Sequência Nucleotídica da Cadeia Pesada (VH):

[00140] 3'cggggaatgtgagagtggccttgccccagtagtcaaagccgtctacatgcc
tcgtacagtaataaatgccagtgtcttcagctcttaagctgttcattgcaggtagacactacttttggaatcatctct
tgagatggtgaacctcccttcacagactcagcatagtatggtgcatgattattagctttgcttctaatttcagcaacc
cactcaagcccccttctctggagactggcggaccagtcctaccaggcgtcactaaaagtgaatccagaggca
gcacaagagagtttcatggatcctccaggttgaccaagcctcctcctgactcctccagcttaactgaccggtc
ga5' (SEQ ID NO: 17)

Sequência Nucleotídica da Cadeia Leve (VL):

[00141] 5'gattattttcttgcacatctcaggagagaggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtat
aagttacatgcactggtaccagcagaagccaggcacctccccaaaagatggatttatgacacatccaaactg
gcttctggagtccctgctcgttcagtgccagtggtctgggacctcttattctctcacaatcagcagcatggag
gctgaagatgctgccacttactgccatcagcggagtagttacctatgcacgttcggtgctgggaccaagct
ggagctgaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccctcgagaccaagaccagc3' (SEQ ID NO:
18)

[00142] Tradução das sequências e respectivos CDRs utilizando o método de definição por Kabat:

VH

[00143] STGQVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWM
DWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSSV
YLQMNSLRAEDTGIYYCTRHRDYDGFYWGQGTTLTFP (SEQ ID NO:
19)

VL

[00144] DYFLASQGEVTMTCSASSISYMHWYQQKPGTSPKRWI
YDTSKLAGVPARFSGSGGTSYSLTISSEMEAEADAATYYCHQRSSYPC
TFGAGTKLELKRADAAPTVSLETKTS (SEQ ID NO: 20)

[00145] Mais especificamente, em que os CDRs compreendem as seguintes sequências: (i) uma sequência VH CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 7, VH CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 8 e VH CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 9; e (ii) uma sequência VL CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 10, VL CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 11 e VL CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 12 ou sequências possuindo 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com as mesmas.

[00146] Mutações podem ser feitas em sequências de DNA codificadoras de anticorpos ou peptídeos aqui fornecidos, tais como nas CDRs, de tal modo que um códon particular é substituído por um códon que codifica um aminoácido diferente. Uma tal mutação é geralmente feita fazendo-se o mínimo possível de trocas. Uma mutação de substituição deste tipo pode ser feita para substituir um aminoácido na proteína resultante em uma maneira não-conservativa (i.e., por troca do códon de um aminoácido pertencendo a um agrupamento de aminoácidos tendo um tamanho ou uma característica particular por um aminoácido pertencendo a outro agrupamento) ou em uma maneira conservativa (i.e., por substituição do códon de um aminoácido pertencendo a um agrupamento de aminoácidos tendo um tamanho ou uma característica particular por um aminoácido pertencendo ao

mesmo agrupamento). Uma substituição conservativa geralmente causa uma mudança menor na estrutura e na função da proteína resultante. Uma troca não-conservativa provavelmente altera mais a estrutura, atividade ou função da proteína resultante. Deve ser considerado que a presente invenção inclui sequências contendo trocas conservativas que não alteram significativamente a atividade ou características de ligação da proteína resultante.

[00147] Os polipeptídeos da presente invenção apresentaram reprodutibilidade quanto à sensibilidade e especificidade. Isto sugere que as proteínas desenvolvidas podem se manter estáveis por longos períodos, mantendo sua capacidade reativa. É possível que a composição do tampão de estoque pode ter favorecido sua estabilidade, o uso de inibidores de proteases, a presença de agente desnaturante no tampão ou, até mesmo, devido à sequência de aminoácidos das mesmas. Proteínas estáveis são consideradas quando existe interesse de aplicação diagnóstica.

[00148] Em uma segunda concretização, a presente invenção revela composições farmacêuticas que compreendem o referido anticorpo monoclonal.

[00149] A composição farmacêutica pode compreender a combinação AcM da presente invenção.

[00150] As referidas composições podem ainda compreender adicionalmente outros agentes antifúngicos.

[00151] Agentes antifúngicos adequados podem ser selecionados do grupo compreendendo (1) um agente antifúngico de polieno, como Natamicina, Rimocidina, Filipina Nistatina, Anfotericina B e Candicina; (2) Antifúngicos de imidazol, como Miconazol, Cetoconazol, Clotrimazol, Econazol, Bifonazol, Butoconazol, Fenticonazol, Isoconazol, Oxiconazol, Sertaconazol, Sulconazol, Tioconazol; (3) antifúngicos de triazol, como FLC, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, terconazol; (4) antifúngicos de alilamina, como terbinafina, amorolfina, naftifina e

butenafina; (5) antifúngicos da equinocandina, como Anidulafungina, Caspofungina e Micafungina.

[00152] Preferivelmente, os agentes antifúngicos adicionais são AmB ou FLC.

[00153] Ademais, as composições farmacêuticas podem ser formuladas com veículos ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis assim como quaisquer outros adjuvantes e diluentes conhecidos por um técnico no assunto com conhecimento geral na área.

[00154] Os veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados compreendem excipientes e auxiliares que facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações que podem ser utilizadas farmacêuticamente. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados são bem conhecidos no estado da técnica e são descritos, por exemplo, em Gennaro, Alfonso, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^o edição 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa., o qual é um texto de referência neste campo técnico. De forma mais específica, excipientes, carreadores ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis não apresentam toxicidade ao organismo receptor nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes como ácido ascórbico e metionina; conservantes como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, fenol, álcool butílico, álcool benzílico, alquil parabenos como metil- e propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol e m-cresol; proteínas como albumina, gelatina ou imunoglobulinas; aminoácidos, monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos como glicose, manose, sucrose, manitol ou sorbitol; excipientes poliméricos como polivinilpirrolidonas, Ficoll®, dextrinas e polietileno glicóis; agentes de sabor; adoçantes; agentes anti-estáticos; agentes quelantes como EDTA ou EGTA; sais liberadores de íons como sódio; complexos

metálicos; surfactantes não-iônicos como polissorbatos 20 e 80; lipídeos como fosfolipídeos, ácidos graxos e esteroides como colesterol. Métodos para preparação de várias composições farmacêuticas são bem conhecidos, ou serão aparentes à luz da presente invenção, pelo especialista da arte em tecnologia farmacêutica.

[00155] Além disto, as composições podem compreender aditivos com o objetivo de aumentar a facilidade de administração, a capacidade de serem estocadas, a resistência à degradação, a biodisponibilidade, a meia vida, prover preparações isotônicas, etc. Aditivos usais para a preparação de composições farmacêuticas são bem conhecidas na arte.

[00156] Veículos farmacêuticamente aceitáveis podem ser rotineiramente selecionados de acordo com o modo de administração e a solubilidade e estabilidade dos peptídeos.

[00157] Por exemplo, formulações para administração intravenosa podem incluir soluções aquosas estéreis que podem também conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados.

[00158] Formulações adequadas para administração parentérica incluem soluções aquosas dos compostos ativos na forma solúvel em água, por exemplo, sais solúveis em água. Além disso, a suspensão do composto ativo, como suspensões de injeções oleosas apropriadas, pode ser administrada. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos, por exemplo, óleo de gergelim, ou ésteres de ácido graxo sintéticos, por exemplo oleato de etila ou triglicerídeos. Suspensões de injeções aquosas que podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluem, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, sorbitol e/ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizadores.

[00159] Composições farmacêuticas para administração oral (em dosagem apropriada) podem estar, preferencialmente, mas não necessariamente, na forma de comprimidos ou cápsulas, tendo o tamanho

convencional na indústria farmacêutica.

[00160] A concentração do anticorpo da invenção nas composições farmacêuticas pode variar de maneira ampla e pode ser selecionada principalmente com base em volumes de fluido, viscosidades, entre outros. O modo de administração particular será determinante. As composições podem compreender ainda mais de um tipo de anticorpo.

[00161] Para qualquer composto, a dose terapeuticamente efetiva pode ser estimada inicialmente, quer em ensaios de cultura de células, por exemplo, de células neoplásicas, quer em modelos animais, usualmente camundongos, coelhos, cães ou porcos. O modelo animal também pode ser usado para se determinar a faixa de concentração apropriada e a via de administração. Informação desse tipo pode então ser usada para se determinar doses úteis e vias para administração em humanos.

[00162] No geral, a quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um veículo farmacêuticamente aceitável para produzir uma forma de dosagem única variará dependendo do sujeito a ser tratado e do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um veículo farmacêuticamente aceitável para produzir uma forma de dosagem única será geralmente a quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, essa quantidade varia de cerca de 0,01 a 99% do ingrediente ativo, de preferência de cerca de 0,1 a 70%, mais preferencialmente de 1 a 30% do ingrediente ativo em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

[00163] As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas por várias rotas de administração incluindo, entre outras, oral, sublingual, nasal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intra-articular, subcutânea, cutânea, transdérmica, não sendo limitada a estas.

[00164] Em uma terceira concretização, a presente invenção revela o uso do referido anticorpo monoclonal na preparação de um medicamento para

tratar infecções fúngicas. O uso pode ser em combinação com outros agentes antifúngicos ativos dentre eles a AmB e/ou FLC.

[00165] Por “combinação”, pode-se entender como sendo administração de dois ou mais agentes terapêuticos para tratar uma doença, condição e/ou distúrbio. Essa administração abrange a co-administração de dois ou mais agentes terapêuticos de maneira substancialmente simultânea, como em uma cápsula única com uma proporção fixa de ingredientes ativos ou em cápsulas múltiplas e separadas para cada agente ativo. Ademais, a administração pode ser sequencial.

[00166] Os anticorpos da invenção podem ser administrados em combinação com outros com fármacos padrão no tratamento de infecções fúngicas. Preferivelmente, AmB, que apresenta amplo espectro contra leveduras e fungos filamentosos e FLC que tem ação fungistática contra *Cryptococcus*.

[00167] Ambos os fármacos apresentam suas ações no ergosterol, sendo a AmB se ligando diretamente ao ergosterol formando poros e o FLC se ligando a enzima lanosterol 14 alfa desmetilase, que é a enzima chave na síntese do ergosterol.

[00168] Em uma quarta concretização, a presente invenção revela um método de diagnóstico de infecções fúngicas que compreende:

(i) prover o referido anticorpo monoclonal ou a referida composição com uma amostra obtida de um indivíduo

(ii) contatar o referido anticorpo monoclonal ou a referida composição com a amostra a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para a formação de complexos antígeno/anticorpo; e

(iii) detectar o complexo antígeno/anticorpo formado na etapa anterior através de uma técnica de detecção capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/anticorpo.

[00169] As amostras podem ser selecionadas do grupo compreendendo

saliva, urina, soro, sangue, lavado bronco-alveolar, líquido ou líquido peritoneal, ou quaisquer outros fluídos biológicos do indivíduo.

[00170] O anticorpo pode compreender um marcador detectável, como um marcador fluorescente, radioisotópico, quimioluminescente ou enzimático, como peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina ou luciferase.

[00171] Numerosos materiais fluorescentes são conhecidos e podem ser utilizados como marcadores. Estes incluem, por exemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, Vermelho Texas, azul AMCA e Amarelo Lúifer. Um material de detecção particular é anticorpo anti-coelho preparado em cabras e conjugado com fluoresceína através de isotiocianato. O peptídeo SLC34A2 ou seu(s) parceiro(s) de ligação também pode(m) ser marcado(s) com um elemento radioativo ou com uma enzima. O marcador radioativo pode ser detectado por qualquer um dos procedimentos de contagem correntemente disponíveis. O isótopo preferido pode ser selecionado de ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{99}Tc , ^{67}Ga , ^{201}Tl e ^{111}In .

[00172] Marcadores de enzima são igualmente úteis, e podem ser detectados por qualquer uma das técnicas colorimétrica, espectrofotométrica, fluoroespectrofotométrica, amperométrica ou gasométrica presentemente utilizadas. A enzima é conjugada na partícula selecionada pela reação com moléculas de ponte tais como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldeído e semelhante. Muitas enzimas que podem ser usadas nestes procedimentos são conhecidas e podem ser utilizadas. As preferidas são peroxidase, β -glicuronidase, β -D-glicosidase, β -D-galactosidase, urease, glicose oxidase mais peroxidase e fosfatase alcalina. Patentes U.S. de Nos. 3.654.090; 3.850.752; e 4.016.043 são referidas por meio de exemplo para sua revelação de métodos e material de marcação alternativos.

[00173] Os meios de detecção podem ser aqueles conhecidos na técnica. Um exemplo não limitativo do meio de detecção pode ser um

conjugado compreendido por um anticorpo acoplado a um composto gerador de sinal, capaz de gerar um sinal detectável.

[00174] Opcionalmente, o anticorpo pode estar ligado a um suporte sólido, que pode acomodar a automação do ensaio. Suportes sólidos adequados incluem, mas não estão limitados a lâminas de vidro ou plástico, placas de cultura de tecidos, poços de microtitulação, tubos, chips ou partículas como contas (*Beads*) selecionados de, mas não restritas, látex, poliestireno ou contas de vidro.

[00175] A invenção pode ser realizada em qualquer método conhecido no campo técnico pode ser usado para conectar o anticorpo ao suporte sólido, incluindo o uso de ligações covalentes e não covalentes, absorção passiva ou pares de porções de ligação ligadas ao anticorpo e ao suporte sólido. A ligação do antígeno e do anticorpo pode ser realizada em qualquer recipiente adequado para conter os reagentes. Exemplos de tais vasos incluem placas de microtitulação, tubos de ensaio e tubos de microcentrífuga.

[00176] Os anticorpos podem ainda ser utilizados principalmente para distinguir infecções fúngica invasivas de infecções bacterianas em ambiente hospitalar e com pacientes de alto risco e/ou imunocomprometidos.

[00177] Em uma quinta concretização, a invenção fornece um kit de diagnóstico de infecções fúngicas que compreende o referido anticorpo monoclonal ou a referida composição e instruções de uso.

[00178] O kit pode ainda compreender um meio de detecção do complexo antígeno/anticorpo, o qual pode compreender um gerador de sinal, capaz de gerar um sinal detectável. Por exemplo, o anticorpo pode ter uma marcação (*label*) com um meio de detecção que permita a detecção do anticorpo quando este estiver ligado ao seu respectivo antígeno.

[00179] Os meios de detecção podem ser um agente de marcação fluorescente, como isocianato de fluoresceína (FIC), isotiocianato de fluoresceína (FITC) e entre outros, uma enzima, como peroxidase de rábano

silvestre (HRP), glicose oxidase ou semelhante, um elemento radioativo como ^{125}I ou ^{51}Cr que produz emissões de raios gama, ou um elemento radioativo que emite pósitrons que produzem raios gama após encontros com elétrons presentes na solução de teste, como ^{11}C , ^{15}O ou ^{13}N . A ligação também pode ser detectada por outros métodos, por exemplo, através de complexos avidina-biotina. Além disso, o agente de marcação pode ser qualquer enzima incluída nos grupos oxidases (como peroxidase de rabanete), luciferases, peptidases (como caspase-3), glicosidases (como beta-galactosidase) e fosfatases (como fosfatase alcalina).

[00180] A ligação dos meios de detecção é de conhecimento geral de um técnico no assunto na área técnica. Neste sentido, os AcM produzidos podem ser metabolicamente marcados pela incorporação de aminoácidos contendo radioisótopos no meio de cultura, ou podem ser conjugados ou acoplados a um meio de detecção através de grupos funcionais ativados.

[00181] Os kits de diagnósticos de infecções fúngicas adequados para a presente invenção podem ser basear preferencialmente nas seguintes técnicas: ELISA, Teste Rápido Imunocromatográfico de Fluxo Lateral e Microarranjos Líquidos.

[00182] O teste de ELISA é um teste imunoenzimático que se baseia em reações antígeno-anticorpo que podem ser detectadas através de reações enzimáticas.

[00183] Os antígenos purificados são fixados sobre um suporte sólidos (por exemplo, uma placa de poliestireno) apropriados. Em seguida, a amostra é adicionada aos poços e, caso a amostra seja de um indivíduo positivo para a referida condição, os anticorpos específicos se ligarão aos antígenos fixados no suporte sólido.

[00184] Após esta etapa, adicionam-se anticorpos ligados a marcadores (peroxidase) contra os anticorpos que se ligam aos antígenos. Desta forma, nos poços nos quais ocorrem a ligação antígeno-anticorpo ocorre coloração ao

ser adicionado o substrato para o marcador.

[00185] A ausência de coloração indica a ausência do anticorpo na amostra contra o antígeno do substrato.

[00186] O teste imunocromatográfico de fluxo lateral é composto pela sobreposição de diferentes membranas montadas sobre cartão adesivo suporte. O anticorpo é imobilizado em membrana de nitrocelulose e essa sobreposta por membrana que recebe a amostra a ser testada na região proximal do cartão. Uma membrana impregnada com compostos (conjugados) que revelam a reação está situada em extremidade da membrana de nitrocelulose e uma membrana absorvente na região distal. As tiras resultantes são encaixadas em dispositivos plásticos.

[00187] O teste utiliza amostras (soro, plasma ou sangue) em volume a ser avaliado, imediatamente seguido da aplicação do tampão. A solução tampão auxilia a migração do conjugado e das proteínas contidas na amostra.

[00188] A migração da amostra ocorre por capilaridade até a área de linhas teste e controle em temperatura ambiente. A leitura visual do teste é realizada após a completa migração da amostra/tampão, que costuma ocorrer em até 15 minutos. Visualização das linhas teste e controle indicam resultado positivo para a doença. Ausência de visualização da linha teste com simultânea marcação da linha controle indica resultado negativo e ausência de visualização da linha controle invalida o teste.

[00189] Microarranjos líquidos é um ensaio realizado em suspensão com uma matriz de microesferas de poliestireno, com 5,6 ou 6,5 micrômetros de diâmetro que funcionam como suporte sólido para o acoplamento de anticorpos através de ligação covalente. A detecção da reação anticorpo-antígeno ocorre com o auxílio de uma molécula de detecção (fluoróforo), em especial a ficoeritrina. Neste sistema é possível empregar uma mistura de diferentes tipos de microesferas, que são uniformes em tamanho, todavia, emitem intensidades de fluorescência distintas.

[00190] O acoplamento ocorre por meio de uma ligação covalente entre a superfície carboxilada das microesferas e aminas primárias presentes em anticorpos.

[00191] As microesferas contêm corantes internos que possuem códigos individuais que se diferenciam quanto ao perfil único de emissão. Dessa forma, é possível realizar uma análise simultânea de múltiplos analitos, pois cada microesfera acoplada covalentemente a um reagente de captura, pode ser distinguida pelo seu espectro.

[00192] A leitura da reação é realizada através da aspiração das microesferas em solução que são transportadas a uma câmara especial. Nesta, as microesferas são centralizadas num fluxo contínuo e de maneira individualizada, de forma que dois lasers interceptem uma única partícula por vez e identifiquem com precisão cada código.

[00193] Em uma sexta concretização, a invenção fornece um kit para tratamento de infecções fúngicas que compreende

(i) anticorpo monoclonal como definido na reivindicação 1 ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 2 a 4; e

(ii) Agentes antifúngicos;

(iii) Instruções para uso dos componentes em combinação.

[00194] Em uma sétima concretização, a invenção fornece um método para o tratamento de infecções fúngicas que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do referido anticorpo ou a referida composição em um indivíduo com necessidade do mesmo.

[00195] Em uma oitava concretização, a invenção fornece um anticorpo ou composição para uso no tratamento de infecções fúngicas em um indivíduo com necessidade do mesmo.

[00196] O uso no tratamento pode ser tanto para tratamento humano, quanto veterinário. Preferencialmente o indivíduo tratado é um ser humano que necessita de tratamento

[00197] A quantidade efetiva precisa para um indivíduo humano dependerá da gravidade do estado de doença, da saúde geral do indivíduo, da idade, do peso, e do sexo do sujeito, da dieta, do tempo e da frequência de administração, da combinação/combinções de drogas, das sensibilidades de reação, e da tolerância/resposta à terapia. Assim, doses a serem fornecidas dependem de um número de fatores que não podem ser mensuradas antes que os estudos de testes clínicos sejam feitos. O técnico no assunto, no entanto, sabe como chegar a doses adequadas para diferentes tratamentos.

[00198] Os exemplos citados a seguir são meramente ilustrativos, devendo ser empregados somente para uma melhor compreensão dos desenvolvimentos constantes na presente invenção, não devendo, contudo, serem utilizados com o intuito de limitar os objetos descritos.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Tipos celulares e condições de crescimento

[00199] As espécies de fungos utilizadas foram *C. neoformans* (sorotipo A, isolado clínico H99 ATCC 208821), *C. gatti* (sorotipo B, cepa R265 ATCC MYA-4093), *C. albicans* (ATCC 90028), *C. neoformans* acapsular (mutante *Cap67* ATCC 52817), *Giardia lamblia* (ATCC 30957), célula de linhagem pulmonar humana A549 (ATCC CCL-185), *Escherichia coli* (ATCC 9637) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Para os ensaios *in vitro* e *in vivo*, as células foram cultivadas em meio mínimo (glicose 15 mM, MgSO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 29,4 mM, glicina 13 mM, tiamina-HCl 3 μM, pH 5,5) e mantidas sob agitação por 2 dias a 30°C. As células foram obtidas por centrifugação, lavadas em PBS e contadas em câmara de Neubauer.

[00200] Foram utilizadas para formação de células híbridas, as células de mieloma linhagem SP2/0 (Sp2/0-Ag14 (ATCC® CRL-1581™) juntamente com as células B oriundas do baço do animal previamente imunizado com quitooligômeros e pelo fungo *C. gattii*. O cultivo foi realizado em meio DMEM (LONZA) suplementado com Glutamina 6,4 mM / SFB 10%. Todo o

conteúdo foi transferido para garrafa do tipo T 25cm² (Corning®) e incubados a 37°C / 5% CO² até atingir viabilidade necessária.

Exemplo 2 - Imunização dos animais

[00201] A imunização dos camundongos se deu da seguinte forma: camundongos da linhagem Balb/C foram imunizados intraperitonealmente (i.p.; 200 µl) a cada 15 dias. Para tal foram utilizadas duas estratégias diferentes: na primeira estratégia, os animais foram imunizados via i.p. com *C. gattii* (1x10⁶céls/ml) previamente fixado em paraformolaldeído (PFA) 4% e lavado em PBS seguido de duas imunizações via i.p. com intervalo de 15 dias com 200 µg de quitotriose livre (trímero de moléculas compostas por unidades de β-1,4-N-acetilglucosamina - β-1,4-GlcNAc), utilizando como adjuvante hidróxido de alumínio (Al(OH)₃ – 1,5mg), respeitando a proporção de 1:1 (v/v). Finalmente, os animais foram imunizados por via intravenosa (i.v.) com 50 µg de quitotriose livre, utilizando PBS como veículo. A segunda estratégia foi idêntica a primeira, exceto pela introdução de uma imunização adicional com quitotriose livre com Al(OH)₃ antes da injeção final, i.v. Em ambas as estratégias foram realizadas a sangria ao final das imunizações para verificar o título dos anticorpos no soro através de ELISA indireto. Foi recolhido o soro pré-imune de todos os animais para ser utilizado como controle e *cut-off* da triagem.

Exemplo 3 - Fusão

[00202] Após quatro/cinco imunizações, foi realizada a esplenectomia dos animais para o processamento dos esplenócitos para a execução da fusão celular com células mielômicas murinas SP2/0 (ATCC), adaptado de Köhler & Milstein 1975.

[00203] Os esplenócitos e as SP2/0 são fusionadas com o auxílio da solução de PEG 3000-3700 a 50%, pré-aquecido a 37°C. Posteriormente, o homogenato de células foi avolumado em meio DMEM suplementado com Glutamina 6,4 mM / Antibiótico (ATB) 1x / SFB 20% em uma proporção de

1×10^8 células/100mL. Todo o volume da suspensão foi transferido para placas de 96 poços para cultura celular (Corning) a 100 μ L/poço, sendo 3 poços da última placa foram adicionados 6×10^4 células SP2/0 que foram utilizadas como controle do meio de seleção. As placas então foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24 horas e um dia após a incubação inicial, 100 μ L de meio DMEM suplementado com Glutamina 6,4 mM / ATB 1x / SFB 20% / hipoxantina, aminoptericina, timidina (HAT) 2x foram adicionados aos poços das placas para o início do processo a seleção das células híbridas viáveis resultantes do processo de fusão durante 14 dias. O sobrenadante dos poços foi utilizado para realizar o ensaio de ELISA indireto específico contra quitotriose.

Exemplo 4 – Elisa Direto

[00204] Foram realizados ELISA (97) indireto em dois momentos: 1) Determinação do título do anticorpo no soro dos animais ao final do processo de imunização; 2) Determinação de anticorpo policlonal e monoclonal específicos para quitooligomêros produzidos pelo hibridoma.

Exemplo 4.1 - ELISA para determinação de título no soro animal

[00205] A placa de 96 poços foi revestida com quitotriose conjugada a BSA na concentração de 0,5 μ g/ml em PBS e incubada durante a noite a 4°C. Após a incubação, a placa foi incubada com PBS/BSA 1% por 1 hora a 37°C, posteriormente foi realizada lavagem e adicionado o soro dos animais em diferentes diluições e incubado 2 horas a 37°C. A placa foi lavada três vezes com PBS/Tween 0,05% e adicionado anti-IgG e anti-IgM murino conjugado a peroxidase e incubado 2 horas a 37°C. Após incubação a placa foi lavada como anteriormente descrito e incubada com Tetrametilbenzidina (TMB) e incubada por 30 minutos a 37°C. A reação foi parada com HCl 1 N e obtivemos a leitura em espectrofotômetro a 450nm.

Exemplo 4.2 - ELISA para determinação de anticorpo policlonal e monoclonal

[00206] Foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente com a diferença que o anticorpo primário da reação foi oriundo do sobrenadante de cultivo dos hibridomas.

Exemplo 5 - Clonagem dos hibridomas policlonais

[00207] A clonagem dos hibridomas policlonais positivos no ensaio de ELISA descrito no item anterior se dá através da contagem das células em câmara de Neubauer de modo que a diluição desta suspensão celular apresente ao final uma concentração de 1 célula/poço em um volume final de 200 µl. O cultivo é incubado a 37°C, 5% CO₂ por 14 dias e são observadas a clonalidade (monoclonal ou policlonal) a partir do 5º dia. Os cultivos que se mantiverem viáveis e monoclonais são novamente submetidos ao ensaio de ELISA para verificar a especificidade frente ao antígeno determinado.

Exemplo 6 - Isotipagem dos clones selecionados

[00208] A isotipagem dos clones previamente selecionados por ELISA foi feita através do kit comercial - Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit – ThermoFisher. Para tal, foi feita uma diluição de 1:10 do sobrenadante de cultivo dos clones e adicionado na placa específica do teste. O kit determina a presença dos isotipos murinos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM presentes na amostra de forma rápida e eficiente.

Exemplo 7 - Extração de RNA dos anticorpos monoclonais selecionados

[00209] A extração de RNA foi feita de cada anticorpo monoclonal oriundo de uma garrafa de cultivo T-25, na qual foi recolhido apenas as células por meio de centrifugação (400 g por 10 minutos a temperatura ambiente). O pellet de cada anticorpo monoclonal foi utilizado para a extração do RNA total com o kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante.

Exemplo 8 - Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (RT-PCR)

[00210] Previamente à etapa de RT-PCR foi realizada a síntese de

cDNA dos monoclonais através do kit comercial Super Script III First-Strand Synthesis System (INVITROGEN).

[00211] Posteriormente, foi realizada a PCR com os oligonucleotídeos iniciadores selecionados a partir da publicação de Zhou et al. 1994 por serem descritos como primers universais para a cadeia variável pesada (VH) e cadeia variável leve (VL) murino como descrito na tabela 2. As sequências obtidas foram avaliadas frente ao banco de dados de Kabat.

[00212] A RT-PCR foi feita de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial 94°C/5 minutos, desnaturação 94°C/2 minutos, anelamento 48°C/1 minuto, extensão 72°C/1 minuto e 30 segundos repetidos por 30 vezes e extensão final 72°C/1 minuto para cadeia VH e as mesmas condições para VL, porém com a temperatura de anelamento de 55°C/1 minuto.

[00213] A visualização das bandas foi feita em gel de agarose 1,5% no tamanho de aproximadamente 570pb para VH e 370pb para VL.

Tabela 2- Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de RT-PCR para amplificação dos cDNAs codificadores para VH e VL murinas a partir da extremidade 5'

VH-Fw	Sequência
307	5' ATG(GA)A(GC)TT(GC)(TG)GG(TC)T(AC)A(AG)CT(GT)G(GA)TT3'
308	5' ATG(GA)AATG(GC)A(GC)CTGGGT(CT)(TA)T(TC)CTCT3'
309	5'GATGTGAAGCTTCAGGAGTC3'
310	5' CAGGTGCAGCTGAAGGAGTC3'
311	5' CAGGTGCAGCTGAAGCAGTC3'
312	5' CAGGTACTCTGAAAGAGTC3'
319	5' GAGGTCCAGCTGCAACAATCT3'
320	5' GAGGTCCAGCTGCAGCAGTC3'
321	5' CAGGTCCAAGCTGCAGCAGCCT3'
322	5' GAGGTGAAGCTGGTGGAGTC3'
324	5' GATGTGAAGCTTGGAAAGTGTC3'
VH-Rev	
γ 1	5' TGGACAGGGATCCAGAGTTCAGGTCAGTC3'
VL-Fw	
353	5' GACATTGTGATGACCCAGTCT3'
362	5' GATGTTTTGATGACCCAAACT3'
364	5' GATATTGTGATAACCCAG3'
365	5' GACATTGTGCTGACCCAATCT3'
390	5' GATATTGTGCTAACTCAGTCT3'
391	5' GATATCCAGATGACACAGACT3'
392	5' GACATCCAGCTGACTCAGTCT3'
393	5' CAAATTGTCTCACCCAGTCT3'

394	5'CAGGCTGTTGTGACTCAGGAA3'
VL-Ver	
K-18	5'TACAGTTGGTGCAGCATC3'

Exemplo 9 - Sequenciamento do DNA dos anticorpos monoclonais selecionados

[00214] O sequenciamento do DNA dos anticorpos monoclonais selecionados foi feito de acordo com o protocolo descrito no kit comercial kit BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies) e para tal foram utilizados os mesmos primers descritos na PCR (exemplo 8). Além disso, foi avaliado a identidade de cada sequenciamento utilizando a ferramenta BLAST – do inglês, Basic Local 54 Alignment Search Tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), entre as sequências de VH e VL dos hibridomas selecionados. As sequências foram analisadas usando o programa SeqMan (DNASStar) e para identificação dos CDR1, 2 e 3, as sequências gênicas foram submetidas a análise pela ferramenta IgBlast (IgBlast Tool – NCBI – NIH; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>).

Exemplo 10 - Purificação dos Anticorpos Monoclonais (AcMs)

[00215] A purificação dos AcMs se deu em três fases: precipitação por PEG, cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de troca iônica no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (AKTA Purifier 10; GE Healthcare).

[00216] A precipitação por PEG foi realizada submetendo o sobrenadante do cultivo a precipitação com polietilenoglicol (PEG 6000) na concentração de 4% (p/v). A suspensão foi mantida sob agitação por três horas à temperatura ambiente (TA) e, em seguida, procedeu-se a centrifugação do material (1600 xg; 30 minutos; 4°C).

[00217] O sobrenadante obtido após a centrifugação foi submetido a uma segunda etapa de precipitação com PEG 6000 na concentração de 6% (p/v), seguida de centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O precipitado obtido foi dissolvido no volume de 15 mL de solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

[00218] O material obtido após a segunda precipitação foi fracionado através da cromatografia de exclusão molecular (SEC) utilizando a coluna Superdex 200 High Load 26 x 60 (320mL) com fluxo de 3,0 mL/min, sendo utilizado como eluente a solução tampão Tris-HCl 50mM, pH=8,0, com volume de coleta igual a 10 mL.

[00219] Após a seleção e pool das amostras provenientes da SEC foi realizada a cromatografia de troca aniônica em coluna Poros HQ 10 x 100. A eluição das frações foi realizada em fluxo de 5,0 mL/min na solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 com gradiente salino em dois segmentos (20% e 50%). As frações foram coletadas com volume de 4,0 mL.

[00220] A homogeneidade das amostras obtidas em cada etapa do processo de purificação foi avaliada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para a estimativa do peso molecular (PM), foi utilizado o padrão comercial Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio- Rad). As proteínas foram reveladas com solução corante Coomassie Blue R350 e o resultado analisado através do software Image Lab™, após o processamento da imagem no sistema Gel Doc™ XR+ (BIO RAD).

Exemplo 11 - Determinação de constante de afinidade e dissociação por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

[00221] Os experimentos de SPR foram realizados usando o sistema BIACORE X (GE Healthcare) equipado com um chip sensor CM5. Os ligantes testados foram os AcM AF1/CC5 e HC6/DD11 (descritos posteriormente em Resultados), aos quais foram imobilizados usando química de acoplamento por amina. As superfícies das duas células de fluxo foram ativadas por 7 min com uma mistura 1: 1 de 0,1 M NHS (N-hidroxissuccinimida) e 0,1 M EDC (3- (N, N-dimetilamino) propil-N-etilcarbodiimida) em uma taxa de fluxo de 10 µl / min. Os ligantes foram imobilizados na concentração de 100 µg/ml em acetato de sódio a 10 mM, pH 5,0. Os resíduos de ésteres foram desativados com uma injeção de 7 min de etanolamina 1 M, pH 8,0.

[00222] Para coletar dados de ligação cinética, o analito BSA-(GlcNAc)₃ foi injetado sobre as duas células de fluxo em concentrações de 0,1 e 0,6 nM em uma taxa de fluxo de 5 µl / min e a uma temperatura de 25°C utilizando tampão HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3Mm EDTA e 0,005% P20) pH 7,4.

[00223] Os dados foram ajustados mediante concentração em um modelo simples de interação (1:1) do ligante e do analito usando a opção de análise de dados global, que possibilita ajustar todos os gráficos obtidos simultaneamente. Todos os dados foram analisados no software BiaEvaluation 4.1.

Exemplo 12 - Ensaio de determinação de sitio de ligação

[00224] As placas de 96 poços foram revestidas com quitotriose-BSA na concentração de 0,5 µg/ml em PBS e incubadas durante a noite a 4°C, seguido de incubação com PBS/BSA 1% por 1 hora a 37°. Posteriormente, foi realizada lavagem (PBS/Tween 0,05%) e adicionada uma solução de lectina do germe de trigo (WGA) conjugada a peroxidase na concentração de 25µg/ml, utilizado como controle da reação. Utilizou-se a WGA fria para o sistema de teste com o intuito de bloquear o sitio de ligação a quitotriose-BSA e os AcM para verificar se haveria ligação a quitotriose-BSA. A WGA fria foi incubada por 1 hora a 37°C e, posteriormente lavada três vezes com PBS/Tween 0,05%. Os AcM foram incubados em concentração de 25µg/ml, seguindo-se incubação por 2 horas a 37°C. A placa foi lavada três vezes com PBS/Tween 0,05% e foram incubados novamente por 2 horas a 37°C com anti-IgM murino conjugado a peroxidase (1:10000). Os sistemas foram lavados como descrito anteriormente e incubados com TMB para revelação das reações sorológicas, conforme descrito anteriormente.

Exemplo 13 – Ensaio funcionais

Exemplo 13.1 - ELISA indireto contra células íntegras adaptado de Stearns et al. 1999

[00225] Para este teste foram utilizados o *C. neoformans* (H99), *Candida albicans*, *Giardia lamblia*, célula de linhagem pulmonar humana A549 (ATCC), *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As células foram lavadas em PBS três vezes e suspensas na densidade de 10^7 células/ml em solução de poli-L-Lisina (5 $\mu\text{g/ml}$ em PBS) para adesão durante a noite a 4°C . No dia seguinte as placas foram bloqueadas com PBS/BSA 5% e incubadas por 1 hora a 37°C para então serem incubadas por 2 horas a 37°C com o AcM anti-quitto-oligômero na concentração de $50\mu\text{g/ml}$ e diluídas até $5\mu\text{g/ml}$. Posteriormente, foi realizada a lavagem com PBS/Tween 0,05% por 3 vezes e adicionado anti-IgM murino peroxidase diluído 1:5000 e incubado por 2 horas a 37°C . As placas foram novamente lavadas e foi adicionado TMB e incubada por 30 minutos a 37°C .

[00226] A reação foi parada com HCl 1 N e obtivemos a leitura em espectrofotômetro a 450nm. Posteriormente a esse ensaio, foi realizado diluições seriadas na densidade das células de 10^7 até 10 células/ml para os fungos e 10^7 até 10^4 células/ml para os outros tipos celulares e testado do AcM anti-quitto-oligômero na concentração de $25\mu\text{g/ml}$, sendo seguido os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

[00227] Além disso, foi realizado ensaio similar com outro derivado da quitina, a quitosana (forma de-acetilada) em diferentes concentrações, mantendo os mesmos procedimentos descritos.

Exemplo 13.2 - Dot Blot contra células íntegras adaptado de Nimrichter et al. 2007

[00228] *C. neoformans* (H99) e *Candida albicans* na densidade de 10^7 células/ml até 10 células/ml foram suspensas em solução de poli-L-Lisina (5 $\mu\text{g/ml}$ em PBS) e $10\mu\text{l}$ foram carregadas em membranas de nitrocelulose. Posteriormente, foi seguido os mesmos passos descritos para o ELISA, porém foi usada a concentração de $25\mu\text{g/ml}$ dos AcM anti-quitooligômeros. A membrana foi cortada e depositada em placas de 96 poços ao qual foi

adicionado 50µl TMB e incubado por 30 minutos a 37°C. O volume foi retirado e transferido para uma nova placa, ao qual foi adicionado a reação de parada com HCl 1 N e lido em espectrofotômetro a 450nm.

Exemplo 13.3 - Avaliação da atividade do AcM anti-quitooligomero contra células íntegras por imunofluorescência adaptado de Rodrigues et al. 2008

[00229] As células fúngicas (10^6 células) foram fixadas (tampão cacodilato paraformaldeído 4%; 30 min) e posteriormente bloqueadas (PBS/BSA 1%; 1hora). Em seguida, foram incubadas com o AcM anti-quitooligomero (25 µg/mL; 1h a 37°C). Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo anti-IgM de camundongo conjugado a Alexa 568 (SIGMA; 1:1000). Após a lavagem em PBS, as células foram incubadas com 25 µM de calcofluor branco (Invitrogen) e lavadas novamente. As suspensões celulares foram montadas em lâminas de vidro e analisadas sob microscópio Olympus AX70, acoplado ao sistema de câmera (QImaging Retiga 1300) e analisados em software QCapture suíte V2.46.

Exemplo 13.4 - Mínima Concentração Inibitória (MIC) adaptado de Joffe et al. 2017

[00230] Células de *C. neoformans* foram cultivadas em RPMI 1640 tamponado com MOPS em pH 7 na densidade de 10^5 células/poço em placas de 96 poços no volume final de 200 µl. Os sistemas foram suplementados com AcM na concentração (25 a 0,05 µg/ml), AmB (1 a 0,1µg/ml) ou FLC (8 a 2 µg/ml), sozinhos ou em associação. Após 48 horas de incubação a 37 ° C sob agitação, as células foram suspensas por pipetagem para leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 592 nm.

Exemplo 13.5 - Formação de Biofilme adaptado de Joffe et al. 2017

[00231] *C. neoformans* (H99 e Cap67) e *Candida albicans* foram cultivados em meio Sabouraud por 24 horas a 30°C. As suspensões celulares foram centrifugadas por 5 minutos a 3000g, lavadas três vezes em PBS e

suspensas em meio mínimo (20 mg/ml tiamina, 30 mM glucose, 26 mM glicina, 20 mM MgSO₄, e 58,8 mM KH₂PO₄). Posteriormente, foram adicionadas à placas de 96 poços (100µl/poço - 1x10⁶células/ml) e cultivadas por 48 horas a 37°C na presença dos AcM (HC6/DD11 e AF1/CC5) e do AcM anti-GXM 18B7 (apenas para H99) na concentração de 25 µg/ml, mantendo sob agitação por 30 minutos para total homogeneização dos AcM com os fungos. Como controle, foi utilizado o fármaco AmB na concentração de 1 µg/ml.

[00232] Foram realizados dois sistemas de análise: o primeiro, as células foram lavadas, afim de que fossem retiradas as células não aderentes e ficassem apenas as células ligadas ao biofilme em formação; o segundo sistema, as células não foram lavadas e todas as células aderidas ou não ao substrato foram quantificadas.

[00233] A atividade metabólica das células viáveis nos dois ensaios foi avaliada pelo método baseado na redução do XTT (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) em espectrofotômetro a 492nm de comprimento de onda.

Exemplo 13.6 - Ensaio de melanização adaptado Walker et al. 2010

[00234] O cultivo do *C. neoformans* foi feito como parágrafo [0221] e a suspensão celular (1x10⁶ células/ml) foi cultivada por 72 horas em meio mínimo suplementado com 1mM de L-DOPA em placa de 96 poços de fundo em “U”. Foram adicionados ao meio mínimo os anticorpos HC6/DD11 e AF1/CC5 em faixa de concentração de 25 a 0,05µg/ml. A placa foi centrifugada e a quantificação da formação de pigmentos foi determinada densitometricamente após a digitalização das imagens pelo equipamento iBright FL1000 Invitrogen.

Exemplo 14 - Ensaio de Sobrevida

[00235] Camundongos da linhagem Balb/C (n=7) foram desafiados letalmente via i.p. com 10⁵ células em PBS de *C. neoformans* (H99) e tratados

2 hora depois com 100 µl de AmB (2,5mg/kg e 0,25mg/kg), 100 µl de AcM (85µg/ml) e 100 µl de uma solução combinada de AcM e AmB (0,25mg/kg). Os animais controle foram desafiados apenas *C. neoformans* (H99) ou apenas com 100 µl de uma solução de PBS, AmB (2,5mg/kg) ou AcM (85µg/ml) sem o fungo (adaptado de Liedke et al). A curva de sobrevivência foi obtida e a análise se estendeu até 90 dias após a infecção, apresentando valor estatístico com $p < 0.005$.

Exemplo 15 - Modelagem Molecular

[00236] As sequências das regiões variáveis dos anticorpos HC6/DD11 e AF1/CC5 foram obtidas por sequenciamento e traduzidas para a obtenção das sequências de aminoácidos correspondentes utilizando a ferramenta de bioinformática ExPASy Translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>).

[00237] A humanização das sequências foram realizadas utilizando o banco de dados IMGT (<http://imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>) para se obter o repertório germinativo humano mais idêntico (identidade percentual) para as cadeias VH e VL.

[00238] A sequências humanizadas obtidas a partir do repertório humano mais idêntico foram alinhadas separadamente utilizando a ferramenta blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) contra o banco de dados do PDB (Protein Data Bank - <https://www.rcsb.org>) para a seleção da proteína molde. A construção do modelo tridimensional foi feita utilizando o programa Modeller 9.19.

[00239] O refinamento das estruturas dos modelos de VH e VL murino e humanizados foram submetidos a análises estruturais nos servidores Molprobit e Verify 3D. As estruturas foram refinadas através da correção de rotâmeros incorretos e conformações dos ângulos phi e psi desfavoráveis, segundo o gráfico de Ramachandran utilizando o programa Coot. O posicionamento espacial de VH/VL GB2 foi determinado através do alinhamento de VH e VL com o modelo de anticorpo neutralizante 5JHL

(Código PDB) anti E-ZIKV utilizando o programa PyMol (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC).

Exemplo 16 - Desenvolvimento de anticorpo monoclonal murino contra quitooligômeros através da tecnologia de hibridoma

Exemplo 16.1 - Titulação dos animais imunizados contra *C. gattii* e quitotriose

[00240] Foram desenvolvidas duas estratégias de imunização e, em ambas, foi realizada sangria ao final da última imunização para verificar o título sérico dos anticorpos (Figura 6). Independente da estratégia adotada, foi obtido o título de 1:3200, tanto para IgG quanto para IgM dosados no soro, sendo utilizado para triagem a quitotriose-BSA. Para estabelecimento de linha de corte, foram utilizados os valores de absorbância obtidos em reações com o soro pré-imune. Foram utilizados os três animais para dar prosseguimento à fusão.

Exemplo 16.2 - Seleção de hibridomas produtores de AcM por ELISA

[00241] Foram realizadas 3 fusões a partir da esplenectomia dos 3 animais. Os esplenócitos foram fusionados com Sp2/0 e foram obtidos 172 hibridomas, 4 dos quais produzindo anticorpos reativos contra quitotriose.

[00242] Os quatro hibridomas produtores de anticorpos policlonais foram submetidos a clonagem, gerando 541 hibridomas produtores de AcM. Nesse grupo, foram selecionados 58 hibridomas reativos contra quitotriose, sendo, finalmente, selecionados para estudos posteriores os 10 hibridomas que apresentaram maior resposta (densidade óptica - D.O. $\geq 3x$ cut-off) em testes de ELISA usando quitotriose-BSA como antígeno primário.

Exemplo 16.3 - Purificação do AcM

[00243] Os 2 AcMs foram purificados através de Cromatografia de Troca Iônica e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 8).

[00244] Todas as alíquotas de IgM apresentaram duas bandas

principais da IgM, correspondentes às cadeias pesadas (~70kDa) e leves (massa molecular variando entre ~23-24kDa) da imunoglobulina M. As demais bandas observadas são sugestivas de redução parcial da IgM e micro heterogeneidade proteica e glicídica.

Exemplo 16.4 - Identificação de CDR

[00245] Os hibridomas produtores dos AcM AF1/CC5 e HC6/DD11 tiveram seu RNA extraídos para gerar um cDNA e conseqüentemente ser amplificado através de PCR as VH e VL de ambos os AcM. Após a amplificação, as cadeias foram sequenciadas e tiveram seus CDRs identificados através de um sistema numeração de Kabat, que é um esquema para a numeração de resíduos de aminoácidos em anticorpos baseados em regiões variáveis. Com o CDR identificado, foi realizado o alinhamento através da base de dados de imunoglobulina, IgBlast, para verificar a identidade dos AcM com as imunoglobulinas depositadas no GeneBank.

[00246] Para tal foi obtida uma identidade muito elevada de ambos os AcM, porém os mesmos tiveram diferenças pontuais no CDR3 de VH do HC6/DD11 onde houve a mudança de um aminoácido com relação ao depositado no banco e alteração no CDR3 de VH e VL do AF1/CC5, sendo que o CDR3 da cadeia pesada houve um maior percentual de alterações chegando a 95% de identidade contra os 99% dos outros CDR3 apontados conforme demonstra a tabela 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3: Identificação do CDR do AcM HC6/DD11.

HC6/DD11 Cadeia Pesada (VH)	Sequência	Sequência Depositada GeneBank	Identidade (%)
CDR1	GFTFSDYGMA (SEQ ID NO: 1)	AAO19699.1	100
CDR2	ISNLAYSIY (SEQ ID NO: 2)	AAO19699.1	100
CDR3	DYYGSSYWYFDV (SEQ ID NO: 3)	AAO19699.1	99
Cadeia Leve (VL)	Sequência	Sequência Depositada GeneBank	Identidade (%)
CDR1	SASSVSYMH (SEQ ID NO 4)	AAB05147.1	100
CDR2	STSNLAS (SEQ ID NO: 5)	AAB05147.1	100
CDR3	QQRSSYPLT (SEQ ID NO: 6)	AAB05147.1	100

Tabela 4: Identificação do CDR do AcM AF1/CC5.

AF1/CC5 Cadeia Pesada (VH)	Sequência	Sequência Depositada GeneBank	Identidade (%)
CDR1	GFTFSDAWMD (SEQ ID NO: 7)	AMN90557.1	100
CDR2	IRSKANNHA (SEQ ID NO 8)	AMN90557.1	100
CDR3	HRYDGFY (SEQ ID NO: 9)	AMN90557.1	95
Cadeia Leve (VL)	Sequência	Sequência Depositada GeneBank	Identidade (%)
CDR1	SASSSISYMH (SEQ ID NO: 10)	AAA63380.1	100
CDR2	DTSKLAS (SEQ ID NO: 11)	AAA63380.1	100
CDR3	QRSSYPCT (SEQ ID NO: 12)	AAA63380.1	99

Exemplo 16.5 - ELISA utilizando PL:

[00247] A PL é um polímero de lisina que confere carga positiva a superfície de garrafas, placas ou lâminas que servem de substrato celular. Fungos possuem parede celular composta de quitina, que é constituída por cadeias longas de *N*-acetilglicosamina, um polímero que possui carga negativa. *C. neoformans*, além da quitina, possui uma capsula polissacarídica constituída predominantemente por glicuronoxilomanana e galactoxilomanana, que também possuem carga negativa na sua estrutura. Diante desse cenário, foi utilizada a PL para alterar a carga da placa (positiva) e conseqüentemente conseguir fazer a adesão das células a essa superfície.

[00248] Neste ensaio, foi utilizado 10^7 células/ml de *C. albicans* para realizar uma curva de absorvância, na qual se observou que tínhamos um sinal confiável na concentração de 25µg/ml de ambos os AcM, já que acima desse valor a curva começa a entrar em platô, como demonstrado na Figura 9. Com o intuito de verificar a sensibilidade de detecção de ambos os AcM, foi realizada uma curva de saturação de células. Foi determinado que o nível máximo de sensibilidade de ambos os AcM foi de 10^3 células/ml. Essa conclusão foi obtida em função da detecção de um sinal de reação considerado positivo 3 vezes maior que o *cut-off* (branco da reação). Entretanto, o sinal obtido pelo anticorpo HC6/DD11 foi ligeiramente mais sensível nas concentrações de 10^4 e 10^5 células/ml, enquanto para o AF1/CC5 obteve-se um platô para ambas as células.

Exemplo 16.6 - Dot Blot utilizando PL

[00249] O princípio utilizado nesse ensaio foi o mesmo do ELISA e se baseou na carga apresentada pelos fungos. Como a membrana de nitrocelulose possui carga negativa, foi utilizada a PL para conferir carga positiva ao fungo e conseqüentemente ter ligação a membrana.

[00250] Como demonstrado na Figura 11, foi inicialmente diluído em 5µg/ml de PL na concentração de 10⁷células/ml e diluído na base 10. Nesse ensaio foi demonstrado que o AcM HC6/DD11 foi capaz de se ligar a *C. albicans* até a ordem de 10⁴células/ml o que se contrapõe ao *C. neoformans* que foi identificado até a ordem de 10⁶células/ml. Foi realizado 3 experimentos independentes para cada ensaio.

Exemplo 16.7 - Imunofluorescência

[00251] A partir dos ensaios confiáveis do ELISA e Dot Blot, foi iniciado os testes de validação de atividade biológica. Nesse sentido, os AcMs foram utilizados através de imunofluorescência (IF), usando o patógeno *Candida albicans* como modelo. Os AcMs se mostraram eficazes na marcação da parede celular fúngica, demonstrando o mesmo perfil quando utilizado marcador padrão (lectina), dados não mostrados. Este experimento foi realizado por 3 vezes e demonstraram o mesmo padrão de resposta, porém a Figura 12 apresenta o dado de um experimento isolado.

Exemplo 16.8 - Ensaio de Melanização

[00252] A habilidade de *C. neoformans* em produzir pigmentos de melanina representa seu segundo mais importante fator de virulência, após a presença da cápsula de polissacarídeo. Diante desse cenário, foi proposto avaliar a atividade dos AcMs no depósito da melanina na parede celular fúngica.

[00253] As concentrações estabelecidas de AcM HC6/DD11 e AF1/CC5 foram de 0,2 a 25µg/ml. A L-DOPA foi utilizada com substrato para a melanização.

[00254] A pigmentação em *C. neoformans* foi avaliada visualmente

através da observação de sedimentação marrom a preto no fundo das placas de 96 poços. Para documentar a pigmentação ou sua inibição, as placas foram fotografadas sobre superfícies brancas (fundo claro), para permitir a diferenciação entre populações pigmentadas e não pigmentadas. Cabe destacar, que todas as doses de AcM apresentaram crescimento fúngico, porém com pigmentação negativa ou inibição parcial.

[00255] Foi demonstrado que os tratamentos com o AcM HC6/DD11 inibem a melanização, parcialmente, até a concentração até a 6,2 µg/ml ($p < 0,05$), enquanto nas concentrações menores não há inibição significativa ($p > 0,05$). O AcM AF1/CC5 inibe a melanização até a concentração de 6,2 µg/ml ($p < 0,001$), enquanto nas concentrações de 3,2 e 1,6 µg/ml ($p < 0,05$) há inibição parcial e nas menores concentrações não há inibição significativa ($p > 0,05$). (Figura 13)

Exemplo 16.9 - Formação de Biofilme

[00256] A formação de biofilme é de grande importância na clínica médica, uma vez que causa dificuldades no tratamento de diversas enfermidades, incluindo a criptococose. Diante desse cenário, foi proposto avaliar o efeito dos AcMs na formação do biofilme por ensaio de XTT.

[00257] Foram testados os AcMs (25 µg/ml) contra três espécies de fungo (*C. albicans*, *C. neoformans* – H99 – e o mutante acapsular de *C. neoformans* - Cap67) tendo como controle o AcM anti-GXM 18B7 (25 µg/ml) apenas para H99. No primeiro ensaio (Figura 14 A e B) as suspensões celulares foram lavadas para retirada das células não aderentes ao substrato. Os AcMs inibiram significativamente a formação de biofilme quando comparadas as células não tratadas e aderidas diretamente ao substrato ($p < 0,05$). No segundo ensaio (Figura 14 C e D) as suspensões celulares não foram lavadas e, novamente, os AcM inibiram a formação do biofilme ($p < 0,05$) quando comparada as células não tratadas com os anticorpos. Em ambos os ensaios foram observados o crescimento das células.

[00258] Os AcMs foram comparados com o AcM anti-GXM 18B7 quanto a inibição da formação de biofilme. Tanto para as suspensões celulares lavadas para aquelas não lavadas, os AcMs foram capazes de inibir significativamente a formação de biofilme da célula H99 quando comparada ao efeito das células não tratadas, além de apresentar comportamento semelhante ao AcM anti-GXM 18B7 ($p < 0,05$) (Figura 15).

[00259] Foi demonstrado que os tratamentos com o AcM afetam a formação de biofilme ($p < 0,05$) quando comparados ao fungo não tratado, além de apresentar um comportamento similar a AmB. Todos os tratamentos testados afetaram apenas a formação de biofilme, pois houve crescimento celular.

Exemplo 16.10 - ELISA contra diversas células utilizando PL

[00260] Neste ensaio foi utilizado o mesmo princípio para marcação de fungo por ELISA utilizando PL, porém foi realizado contra diferentes tipos celulares para demonstrar que o AcMs são específicos contra quintina e conseqüentemente contra fungo. Para tal foi utilizado uma linhagem de célula pulmonar humana, A549, *Giardia lamblia* e bactéria gram negativa e gram positiva. O gráfico demonstra que em todas as densidades celulares os AcMs não foram capazes de identificar o alvo específico em contrapartida apresentou o mesmo resultado para a identificação do alvo em *C. neoformans*, o que demonstra que os AcMs são alvos específico e conserva sua sensibilidade em 10^6 células/ml como demonstra a Figura 16. O experimento foi realizado por 3 vezes, as quais mantiveram sua reprodutibilidade.

Exemplo 16.11 - Ensaio de Mínima Concentração Inibitória

[00261] A atividade fungicida dos AcMs foi testada através do teste de CIM. Nenhum dos AcMs apresentaram efeito fungicida, ao contrário dos controles com 1 $\mu\text{g/ml}$ de AmB e 8 $\mu\text{g/ml}$ de FLC (Figura 18 e 19). Foi avaliado se a associação dos AcMs com AmB ou FLC potencializaria efeitos antifúngicos em concentrações sub-inibitórias, desta forma foram utilizadas as

concentrações 0,1 µg/ml de AmB e de 4 e 2 µg/ml para o FLC em combinação com diferentes concentrações dos AcMs. Para avaliar se houve efeito combinatório dos AcMs com o fármaco, foi utilizado como base a ação do fármaco de forma isolada.

[00262] Ao avaliar a ação fungicida dos AcMs em combinação com a concentração sub-inibitória de AmB, foi observado que a concentração de 6,2 µg/ml de ambos os anticorpos potencializou a ação fungicida da AmB na sua concentração sub-inibitória quando comparada a ação isolada do fármaco em sua concentração ideal de ação ($p < 0.001$). Entretanto, houve potencialização do efeito fungicida da AmB 0,1 µg/ml quando em combinação com anticorpo HC6/DD11 a partir da concentração de 1,6 µg/ml ($p < 0,01$), enquanto para o anticorpo AF1/CC5 o efeito combinatório apresentou efeito fungicida a partir da concentração de 3,2 µg/ml ($p < 0,01$), quando comparado a concentração sub-inibitória de AmB isolada (Figura 18).

[00263] Com relação ao efeito combinatório dos AcMs com o FLC, foi observado o efeito fungicida parcial dos anticorpos (3,2 µg/ml para ambos o AcM) em combinação com o FLC (4 µg/ml) ($p < 0.01$). Desta forma, houve potencialização da ação do fármaco quando comparada com a forma isolada na concentração de 4 µg/ml. Além disso, foi observada ação fungicida combinatória dos AcMs com o FLC na concentração de 2 µg/ml, visto que potencializou a ação do fármaco alcançando níveis da forma isolada na concentração de 4 µg/ml

Exemplo 16.12 - Ensaio de Sobrevida

[00264] Os camundongos foram letalmente desafiados com um inóculo i.p. de 1×10^5 células de levedura *C. neoformans* cepa H99. Após 2 horas foram tratados com PBS (controle negativo), 85 µg/animal de AcM (HC6/DD11) de forma isolada, 0,25 ou 2,5mg/kg de AmB de forma isolada e de forma sinérgica o AcM mantendo as concentrações teste. Os tratamentos foram repetidos por mais duas vezes com um intervalo de 10 dias.

[00265] Os animais infectados com *C. neoformans* e tratados com PBS morreram no dia 28 pós infecção, enquanto os tratados com AcM morreram até o dia 29, o grupo dos animais tratados apenas com AmB a 0,25 mg/kg vieram a óbito no dia 37, enquanto o grupo sinérgico (AcM -85µg/animal - com AmB - 0,25 mg/kg -) não apresentou óbito. O grupo controle tratado com a dose padrão de AmB (2,5mg/kg) não houve óbito como esperado (dado não mostrado). Desta forma, foi obtido 100% de sobrevivência dos animais infectados com *C. neoformans* e tratados com AcM HC6/DD11 e AmB subinibitória.

[00266] O grupo sinérgico foi significativamente estatístico com relação ao grupo tratado com PBS e AcM ($p \leq 0.001$). O mesmo foi observado com relação ao grupo tratado com AmB (0,25 mg/kg) ($p = 0.01$). Os animais sobreviventes do grupo tratado com mAb e AmB não apresentaram sintomas até o final do experimento (90 dias) (Figura 20).

Exemplo 16.13 - Modelagem Comparativa

[00267] Com o intuito de humanizar os AcM murinos, foi realizado um alinhamento das cadeias leve e pesada dos AcM HC6/DD11 e AF1/CC5 contra o banco de dados de anticorpos humanos do IMGT (<http://imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>). As sequências que apresentaram maior homologia para HC6/DD11 cadeia pesada e leve foram, respectivamente, IGHV3-11*01 e IGKV1-16*01, enquanto para o AF1/CC5 foram, respectivamente, IGHV3-73*01 e IGKV1-17*03. Os aminoácidos que diferiam entre as sequências murinas e humanas foram substituídas pelos aminoácidos presentes no framework dos anticorpos humanos.

[00268] Para obter as estruturas tridimensionais dos anticorpos HC6/DD11 e AF1/CC5 murinos e humanizados foi utilizada a metodologia de modelagem molecular. Realizou-se um alinhamento local através do BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool)) contra o banco de dados PDB para a

escolha e seleção das proteínas molde. Foram utilizados como modelo para o AcM HC6/DD11 murino a sequência 4U0R, enquanto para AF1/CC5 murino as seguintes sequências de cadeia pesada e leve, respectivamente, 5IJK 3NFT. Com relação ao humanizado do HC6/DD11 foi utilizada a sequência 5F72, enquanto para o humanizado do AF1/CC5 cadeia pesada e leve foram 6MAM e 3NFP, respectivamente.

[00269] A construção dos modelos tridimensionais foi feita utilizando o programa Modeller 9.19. Os modelos murinos e humanizados obtidos foram submetidos a minimização de energia utilizando o programa Wincoot e alinhados entre si para verificar as estruturas preditas (Figura 21).

REFERÊNCIAS

[00270] 1. Kö Hler JR, Casadevall A, Perfect J. The Spectrum of Fungi That Infects Humans. [cited 2018 Dec 6]; Available from: www.perspectivesinmedicine.org.

[00271] 2. Heitman J. Microbial Pathogens in the Fungal Kingdom. 2011 [cited 2018 Dec 6]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3081590/pdf/nihms-264974.pdf>.

[00272] 3. Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. 2014 [cited 2018 Aug 15]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.001>.

[00273] 4. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. J Fungi [Internet]. 2017;3(4):57. Available from: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/57>.

[00274] 5. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: Human fungal infections. Sci Transl Med. 2012;4(165).

[00275] 6. Vallabhaneni S, Mody RK, Walker T, Chiller T. The Global

Burden of Fungal Diseases. 2016 [cited 2018 Aug 22]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.004>.

[00276] 7. Benedict K, Richardson M, Vallabhaneni S, Jackson BR, Chiller T. Fungal infections 7 Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. *Ser Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017 [cited 2018 Aug 17];17:403–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>.

[00277] 8. Nucci M, Marr K a. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis*. 2005;41(4):521–6.

[00278] 9. Harris JR, Lockhart SR, Sondermeyer G, Vugia DJ, Crist MB, Tobin D'angelo M, et al. *Cryptococcus gattii* Infections in Multiple States Outside the US Pacific Northwest. 2013 [cited 2018 Aug 22];19(10). Available from: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1910.130441>.

[00279] 10. Harris JR, Lockhart SR, Debess E, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wohrle R, et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: Clinical Aspects of Infection With an Emerging Pathogen. [cited 2018 Aug 22]; Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/53/12/1188/400737>.

[00280] 11. Polvi EJ, Li X, O'meara TR, Leach MD, Cowen LE. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. [cited 2018 Aug 16]; Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00018-015-1860-z.pdf>.

[00281] 12. Leach MD, Cowen LE. Surviving the Heat of the Moment: A Fungal Pathogens Perspective [Internet]. [cited 2018 Aug 21]. Available from: <http://www.wellcome.ac.uk/Funding/>.

[00282] 13. Bain JM, Lewis LE, Okai B, Quinn J, Gow NAR, Erwig L-P. Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2012 [cited 2018 Aug 21];49:677–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3430864/pdf/main.pdf>.

- [00283] 14. Moraes Nicola A, Robertson EJ, Albuquerque P, da Silveira Derengowski L, Casadevall A. Nonlytic Exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from Macrophages Occurs In Vivo and Is Influenced by Phagosomal pH. 2011 [cited 2018 Aug 21]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3150755/pdf/mBio.00167-11.pdf>.
- [00284] 15. Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2018 Aug 21];87:1–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002612000013?via%3Dihub>.
- [00285] 16. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. [cited 2018 Aug 21]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5818156/pdf/nihms886671.pdf>.
- [00286] 17. Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*. 2016;59(3):145–50.
- [00287] 18. Roemer T, Krysan DJ. Antifungal Drug Development : Challenges , Unmet Clinical Needs , and New Approaches. 2016;.
- [00288] 19. Kontoyiannis DP. Antifungal Resistance: An Emerging Reality and A Global Challenge. *Glob Chall Antifung Resist • JID* [Internet]. 2017 [cited 2018 Sep 18];2017:216. Available from: https://academic.oup.com/jid/article-abstract/216/suppl_3/S431/4107053.
- [00289] 20. Spivak ES, Hanson KE. *Candida auris* : an Emerging Fungal Pathogen. Kraft CS, editor. *J Clin Microbiol*. 2017 Nov;56(2):e01588-17.

- [00290] 21. Ostermann H, Solano C, Jarque I, Garcia-Vidal C, Gao X, Barrueta JA, et al. Cost analysis of voriconazole versus liposomal amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis among patients with haematological disorders in Germany and Spain [Internet]. Vol. 15. 2014 [cited 2018 Aug 21]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/2050-6511/15/52>.
- [00291] 22. Lin X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):401–16.
- [00292] 23. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The Case for Adopting the ‘Species Complex’ Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. 2017 [cited 2018 Dec 11]; Available from: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00357-16>.
- [00293] 24. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2015 May [cited 2019 Aug 20];78:16–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184515000328>.
- [00294] 25. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis [Internet]. [cited 2018 Dec 11]. Available from: www.perspectivesinmedicine.org.
- [00295] 26. Chayakulkeeree M. *Cryptococcosis*. 2006;20:507–44.
- [00296] 27. Colombo ANAC, Rodrigues ML. Fungal colonization of the brain: anatomopathological aspects of neurological cryptococcosis epidemic in HIV patients (Armstrong-James et al . people die each year because of systemic fungal cryptococcosis presented in the last (9 th) edition and *Cryp.* 2015;87:1293–309.
- [00297] 28. Lin X, Heitman J. *The Biology of the Cryptococcus*

- neoformans Species Complex. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2006;60(1):69–105. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>.
- [00298] 29. Casadevall A, Pirofski L-A. MINIREVIEWS Accidental Virulence, Cryptic Pathogenesis, Martians, Lost Hosts, and the Pathogenicity of Environmental Microbes. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2007 [cited 2018 Dec 11];6(12):2169–74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168257/pdf/0308-07.pdf>.
- [00299] 30. Dutra FF, Albuquerque PC, Rodrigues ML, Fonseca FL. Warfare and defense: The host response to *Cryptococcus* infection. *Fungal Biol Rev* [Internet]. 2018;32(2):35–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.09.002>.
- [00300] 31. Templeton S, Pirofski L-A, Johnston SA, Wormley FL, Williamson PR, Elsegeiny W, et al. immunology of *Cryptococcal* infections: Developing a Rational Approach to Patient Therapy. 2018 [cited 2018 Aug 10];9:651. Available from: www.frontiersin.org.
- [00301] 32. Olszewski MA, Wormley FL, Williamson Sarah E, Hardison PR, Malachowski AN, Davis JJ, Vedula P, et al. Polarization Response by Promoting Macrophage M2 during the Afferent Phase of the Immune *Cryptococcus neoformans* Expansion of Homolog Ssa1 Contributes to Pulmonary *Cryptococcal* Heat Shock Protein 70. *J Immunol Ref* [Internet]. 2015 [cited 2019 Feb 6];194:5999–6010. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/194/12/5999><http://www.jimmunol.org/content/194/12/5999.full#ref-list-1>.
- [00302] 33. Campuzano A, Wormley FL. Innate Immunity against *Cryptococcus*, from Recognition to Elimination. [cited 2018 Aug 10]; Available from: www.mdpi.com/journal/jof.
- [00303] 34. Olszewski MA, Wormley FL, Chrissy Leopold Wager JM, Hole CR. Mice Infection in *Cryptococcus neoformans* against STAT1

- Signaling Is Essential for Protection. *J Immunol Ref* [Internet]. 2014 [cited 2019 Aug 20];193:4060–71. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/193/8/4060><http://www.jimmunol.org/content/193/8/4060.full#ref-list-1>.
- [00304] 35. Leopold Wager CM, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL, Jr. Cryptococcus and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2018 Aug 10];7:105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26903984>.
- [00305] 36. Liu T-B, Perlin DS, Xue C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. 2012 [cited 2019 Feb 6]; Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kvir20>.
- [00306] 37. Kozel TR, Wickes B. Fungal Diagnostics. [cited 2018 Aug 24]; Available from: www.perspectivesinmedicine.org.
- [00307] 38. Theel ES, Doern CD. D-Glucan Testing Is Important for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. 2013 [cited 2018 Aug 27]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3889722/pdf/zjm3478.pdf>.
- [00308] 39. Schwartz S, Kontoyiannis DP, Harrison T, Ruhnke M. Advances in the diagnosis and treatment of fungal infections of the CNS. *Lancet Neurol* [Internet]. 2018;17(4):362–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30030-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30030-9).
- [00309] 40. Meya DB, Manabe YC, Castelnuovo B, Cook BA, Ali M, Kambugu A, et al. Serum Cryptococcal Antigen (CRAG) Screening is a Cost-Effective Method to Prevent Death in HIV- infected persons with CD4 $\leq 100/\mu\text{L}$ starting HIV therapy in Resource-Limited Settings. *Clin Infect Dis*. 2010;51(4):448–55.
- [00310] 41. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: Spectrum of Disease, Diagnosis, and Treatment. [cited 2018 Aug 24]; Available from: https://ac.els-cdn.com/S0891552006000511/1-s2.0-S0891552006000511-main.pdf?_tid=

507238c0-e399-4d35-a636-9d578d958447&acdnat=1535138005_2968e56d5f508d2a5e02c85f2d1d7496.

[00311] 42. Ramanan P, Wengenack NL, Theel ES. Laboratory Diagnostics for Fungal Infections: A Review of Current and Future Diagnostic Assays. *Clin Chest Med* [Internet]. 2017;38(3):535–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.013>.

[00312] 43. Powers-Fletcher M V, Hanson KE. Nonculture Diagnostics in Fungal Disease. *Infect Dis Clin NA* [Internet]. 2016 [cited 2018 Aug 27];30:37–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.005>.

[00313] 45. Lamoth F. Galactomannan and 1,3- β -D-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J Fungi* [Internet]. 2016;2(3):22. Available from: <http://www.mdpi.com/2309-608X/2/3/22>.

[00314] 46. Jaijakul S, Vazquez JA, Swanson RN, Ostrosky-Zeichner L. 3)- β -D-Glucan as a Prognostic Marker of Treatment Response in Invasive Candidiasis. [cited 2019 Aug 20];.

[00315] 47. Nguyen H, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, et al. Performance of Candida Real-time Polymerase Chain Reaction, b-D-Glucan Assay, and Blood Cultures in the Diagnosis of Invasive Candidiasis. [cited 2018 Aug 28]; Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/54/9/1240/391720>.

[00316] 48. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, et al. Diagnostic Accuracy of Serum 1,3-D-Glucan for Pneumocystis jiroveci Pneumonia, Invasive Candidiasis, and Invasive Aspergillosis: Systematic Review and Meta-Analysis Downloaded from. 2011 [cited 2018 Aug 28]; Available from: <http://jcm.asm.org/>.

[00317] 49. Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, Touratier S, Raffoux E, Menotti J, et al. Use and limits of (1-3)- β -D-glucan assay (fungitell), compared to galactomannan determination (platelia Aspergillus), for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2014;.

- [00318] 50. Azab MM, Taleb AFA, Mohamed NAE, Omran FH. Rapid Diagnosis of Invasive Fungal Infections [Internet]. Vol. 4, Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 2015 [cited 2018 Aug 29]. Available from: <http://www.ijcmas.com>.
- [00319] 51. Singh N, Paterson DL. Aspergillus Infections in Transplant Recipients. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2005 [cited 2018 Aug 29];18(1):44–69. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC544171/pdf/0014-04.pdf>.
- [00320] 52. Fisher CE, Stevens AM, Leisenring W, Pergam SA, Boeckh M, Hohl TM. Independent contribution of bronchoalveolar lavage and serum galactomannan in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis.
- [00321] 53. Rampini SK, Zbinden A, Speck RF, Bloemberg G V. Similar efficacy of broad-range ITS PCR and conventional fungal culture for diagnosing fungal infections in non-immunocompromised patients. 2016 [cited 2018 Aug 29]; Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12866-016-0752-1>.
- [00322] 54. Zeller I, Schabereiter-Gurtner C, Mihalits V, Selitsch B, Barousch W, Hirschl AM, et al. Detection of fungal pathogens by a new broad range real-time PCR assay targeting the fungal ITS2 region. 2018 [cited 2018 Sep 18]; Available from: www.ebi.ac.uk/cluster/.
- [00323] 55. Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, Bernal-Martinez L, Prieto M, Garcia-Reyne A, et al. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2013 [cited 2019 Aug 21];19:E271–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>.
- [00324] 56. Rodrigues ML, Carlos Chagas I, Oswaldo Cruz F. The Multifunctional Fungal Ergosterol. 2018 [cited 2018 Sep 18]; Available from:

<https://doi.org/10.1128/mBio.01755-18>.

[00325] 57. Pelleschi Taborda C, Frases S, Rao Juvvadi P, Fusco-Almeida AM, Scorzoni L, A de Paula Silva AC, et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. 2017 [cited 2018 Aug 23]; Available from: www.frontiersin.org.

[00326] 58. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. 2014;(June).

[00327] 59. Edith Albengres, Hervé Le Louët J-PT, Tillement J-P. Systemic Antifungal Agents. Drug Saf [Internet]. 1998 [cited 2019 Aug 22];18(2):83–97. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00002018-199818020-00001>.

[00328] 60. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus* [Internet]. Vol. 41. 1997 [cited 2019 Aug 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163916/pdf/411364.pdf>.

[00329] 61. Lemke F Kiderlen O Kayser Amphotericin B AA. MINI-REVIEW. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2005 [cited 2018 Sep 25];68:151–62. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00253-005-1955-9.pdf>.

[00330] 62. Spitzer M, Robbins N, Wright GD. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. 2017 [cited 2019 Feb 26]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1196300>.

[00331] 63. Zotchev S. Polyene Macrolide Antibiotics and their Applications in Human Therapy. Curr Med Chem. 2012;10(3):211–23.

[00332] 64. Alvarez C, Andes DR, Kang JY, Krug C, Kwon GS. Antifungal Efficacy of an Intravenous Formulation Containing Monomeric Amphotericin B, 5-Fluorocytosine, and Saline for Sodium Supplementation HHS Public Access. Pharm Res [Internet]. 2017 [cited 2018 Sep

- 25];34(5):1115–24. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5383515/pdf/nihms853112.pdf>.
- [00333] 65. Steimbach LM, Tonin FS, Virtuoso S, Borba HHL, Sanches ACC, Wiens A, et al. Efficacy and safety of amphotericin B lipid-based formulations—A systematic review and meta-analysis. *Mycoses*. 2017;60(3):146–54.
- [00334] 66. Borba HHL, Steimbach LM, Riveros BS, Tonin FS, Ferreira VL, Bagatim BA de Q, et al. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. *Mycoses*. 2018;61(10):754–63.
- [00335] 67. Hamill RJ. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2019 Aug 22];73(9):919–34. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s40265-013-0069-4>.
- [00336] 68. Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, Mcleod HL, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. 2011 [cited 2019 Aug 22]; Available from:
<http://www.pharmgkb.org/search/annotatedGene/mthfr/index.jsp>.
- [00337] 69. Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA. Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2005 [cited 2019 Aug 22];18(1):163–94. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC544182/pdf/0092-03.pdf>.
- [00338] 70. Fesel PH, Zuccaro A. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2016 May [cited 2019 Aug 22];90:53–60. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184515300529>.
- [00339] 71. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* [Internet]. 2003 Jun [cited 2019 Aug

- 22];11(6):272–9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X03001173>.
- [00340] 72. Kurtz MB, Douglas CM. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase [Internet]. Vol. 35, Journal of Medical & Veterinary Mycology. 1997 [cited 2019 Aug 22]. Available from:
<https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/35/2/79/940389>.
- [00341] 73. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Immunologia Celular e Molecular. 8th ed. Digital T, editor. Rio de: Elsevier Inc.; 2015. 549 p.
- [00342] 74. Köhler G, Milstein C. Pillars Article : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975, 256 (5517): 495-497. J Immunol. 2005;174(5517):2453–5.
- [00343] 75. Dos Santos ML, Quintilio W, Manieri TM, Tsuruta LR, Moro AM. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. Brazilian J Pharm Sci. 2018;54(Special Issue):1–15.
- [00344] 76. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. MAbs [Internet]. 2019;11(2):219–38. Available from:
<https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1556465>.
- [00345] 77. Casadevall A, Pirofski L-A. IMMUNOGLOBULINS IN DEFENSE, PATHOGENESIS AND THERAPY OF FUNGAL DISEASES. 2012 [cited 2018 Nov 16]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3360875/pdf/nihms375082.pdf>.
- [00346] 78. Nosanchuk JD, Steenbergen JN, Shi L, Deepe GS, Casadevall A, Casadevall A. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. J Clin Invest [Internet]. 2003 Oct [cited 2018 Nov 8];112(8):1164–75. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub med/14561701>.
- [00347] 79. Rachini A, Pietrella D, Lupo P, Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, et al. An Anti-Glucan Monoclonal Antibody Inhibits Growth and Capsule Formation of *Cryptococcus neoformans* In Vitro and Exerts

- Therapeutic, Anticryptococcal Activity In Vivo. *Infect Immun* [Internet]. 2007 [cited 2018 Jul 5];75(11):5085–94. Available from: <http://iai.asm.org/>.
- [00348] 80. Rodrigues ML, Shi L, Barreto-Bergter E, Nimrichter L, Farias SE, Rodrigues EG, et al. Monoclonal antibody to fungal glucosylceramide protects mice against lethal *Cryptococcus neoformans* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(10):1372–6.
- [00349] 81. Guimarães AJ, de Cerqueira MD, Nosanchuk JD. Surface architecture of *Histoplasma capsulatum*. *Front Microbiol*. 2011;2(NOV):1–14.
- [00350] 82. Guimarães AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Monoclonal Antibodies to Heat Shock Protein 60 Alter the Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum* †. *Infect Immun* [Internet]. 2009 [cited 2018 Sep 20];77(4):1357–67. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663142/pdf/1443-08.pdf>.
- [00351] 83. Kauffman CA. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2007 [cited 2018 Nov 5];20(1):115–32. Available from: <http://cmr.asm.org/>.
- [00352] 84. Huang H-R, Fan L-C, Rajbanshi B, Xu J-F. Evaluation of a New Cryptococcal Antigen Lateral Flow Immunoassay in Serum, Cerebrospinal Fluid and Urine for the Diagnosis of Cryptococcosis: A Meta-Analysis and Systematic Review. 2015 [cited 2018 Aug 27]; Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0127117&type=printable>.
- [00353] 85. Rivera J, Zaragoza O, Casadevall A. Antibody-Mediated Protection against *Cryptococcus neoformans* Pulmonary Infection Is Dependent on B Cells. *Infect Immun* [Internet]. 2005 [cited 2018 Jan 18];73(2):1141–50. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC546959/pdf/0809-04.pdf>.
- [00354] 86. Posch W, Steger M, Wilflingseder D, Lass-Flörl C.

- Promising immunotherapy against fungal diseases. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2017 [cited 2018 Aug 23];17(7):861–70. Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iebt20>.
- [00355] 87. Martinez LR, Casadevall A. Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy. *Infect Immun* [Internet]. 2005 [cited 2019 Feb 27];73(10):6350–62. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1230912/pdf/0374-05.pdf>.
- [00356] 88. Martinez LR, Moussai D, Casadevall A. Antibody to *Cryptococcus neoformans* Glucuronoxylomannan Inhibits the Release of Capsular Antigen. *Infect Immun*. 2004;72(6):3674–9.
- [00357] 89. Moragues MD, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Sevilla MJ, Conti S, Polonelli L, et al. A Monoclonal Antibody Directed against a *Candida albicans* Cell Wall Mannoprotein Exerts Three Anti-*C. albicans* Activities. *Infect Immun*. 2003;71(9):5273–9.
- [00358] 90. Casadevall A, Pirofski L-A. A new synthesis for antibody-mediated immunity NIH Public Access. *Nat Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2019 Aug 22];13(1):21–8. Available from: <http://www.nature.com/reprints/index.html>.
- [00359] 91. Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, De Bernardis F, Palma AS, Liu Y, et al. Protection by Anti-b-Glucan Antibodies Is Associated with Restricted b-1,3 Glucan Binding Specificity and Inhibition of Fungal Growth and Adherence. [cited 2019 Feb 26]; Available from: www.plosone.org.
- [00360] 92. Brena S, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Cabezas J, Moragues MD, Pontón J. Fungicidal Monoclonal Antibody C7 Binds to *Candida albicans* Als3. *Infect Immun* [Internet]. 2007 [cited 2019 Aug 23];75(7):3680–2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1932956/pdf/1840-06.pdf>.

- [00361] 93. Guimarães AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Monoclonal Antibodies to Heat Shock Protein 60 Alter the Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum* †. *Infect Immun* [Internet]. 2009 [cited 2018 Nov 7];77(4):1357–67. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663142/pdf/1443-08.pdf>.
- [00362] 94. Beenhouwer DO, Yoo EM, Lai C-W, Rocha MA, Morrison SL. Human Immunoglobulin G2 (IgG2) and IgG4, but Not IgG1 or IgG3, Protect Mice against *Cryptococcus neoformans* Infection. *Infect Immun* [Internet]. 2007 [cited 2019 Aug 23];75(3):1424–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828574/pdf/1161-06.pdf>.
- [00363] 95. Buissa-Filho R, Puccia R, Marques AF, Pinto FA, Muñoz JE, Nosanchuk JD, et al. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. *Infect Immun*. 2008;76(7):3321–8.
- [00364] 96. Smulian AG, Sullivan DW, Theus SA. Immunization with recombinant *Pneumocystis carinii* p55 antigen provides partial protection against infection: characterization of epitope recognition associated with immunization [Internet]. Vol. 2, *Microbes and Infection*. 2000 [cited 2019 Aug 23]. Available from: <https://pdf.sciencedirectassets.com>.
- [00365] 97. Saeed AFUH, Ling S, Yuan J, Wang S. The Preparation and Identification of a Monoclonal Antibody against Domoic Acid and Establishment of Detection by Indirect Competitive ELISA. 2017 [cited 2019 Feb 7]; Available from: www.mdpi.com/journal/toxins.
- [00366] 98. Goding, Anocloides Monoclonal: Principles and Practice, pp. 59-103). (Academic Press, 1986).
- [00367] 99. Erwig LP, R Gow NA. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Mar;14(3):163-76. doi: 10.1038/nrmicro.2015.21.

- [00368] 100. Katzung B, Masters S, Trevor A. Farmacologia básica e clínica. 12º edição Porto Alegre. AMGH, 2014.
- [00369] 101. Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)).
- [00370] 102. Bird et al., Science, 242, 423-426, 1988;.
- [00371] 103. Huston et al., PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988).
- [00372] 104. Power e Hudson, J Immunol. Methods 242: 193-204 9 (2000)).
- [00373] 105. Holliger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993).
- [00374] 106. Hoogenboom et al. Trends Biotechnol, 15:62-70 (1997);.
- [00375] 107. Hoogenboom, et al. Immunotechnology 4:1-20 (1998);.
- [00376] 108. McGregor et al. Mol. Biotechnol, 6:155-62 (1996);.
- [00377] 109. Bird et al., Science, 242:423-426 (1988);.
- [00378] 110. King "Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies" Taylor & Francis, 1998.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo, caracterizado por compreender (i) uma sequência VH CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 1, VH CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 2 e VH CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 3; e (ii) uma sequência VL CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 4, VL CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 5 e VL CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 6; ou

(i) uma sequência VH CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 7, VH CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 8 e VH CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 9; e (ii) uma sequência VL CDR1 como descrita na SEQ ID NO: 10, VL CDR2 como descrita na SEQ ID NO: 11 e VL CDR3 como descrita na SEQ ID NO: 12.

2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um anticorpo monoclonal.

3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por ser um anticorpo murino, anticorpo humanizado, anticorpo humano ou anticorpo quimérico.

4. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender o anticorpo como definido na reivindicação 1, 2 ou 3.

5. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por compreender polímeros e/ou azóis.

6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por compreender preferencialmente AmB e/ou FLC.

7. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 4, 5 ou 6 caracterizada por compreender ainda um veículo/excipientes farmacêuticamente aceitável.

8. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 7, caracterizada por ser para uso no tratamento de infecções fúngicas.

9. Uso do anticorpo como definido na reivindicação 1 a 3, caracterizado por ser para a preparação de um medicamento para tratar infecções fúngicas.

10. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por estar em combinação com polienos e/ou azóis.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por estar em combinação com AmB e/ ou FLC.

12. Método de diagnóstico de infecções fúngicas, caracterizado por compreender:

(i) prover o anticorpo como definido na reivindicação 1 a 3 ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 4 a 8 com uma amostra obtida de uma paciente,

(ii) contatar o referido anticorpo ou a referida composição com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para a formação de complexos anticorpo/antígeno; e

(iii) detectar o complexo antígeno/anticorpo formado na etapa anterior através de uma técnica de detecção capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/anticorpo.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por a amostra biológica ser selecionada do grupo compreendendo saliva, urina, soro, sangue, lavado bronco-alveolar, líquido ou líquido peritoneal, ou quaisquer outros fluídos biológicos do paciente.

14. Kit de diagnóstico de infecções fúngicas, caracterizado por compreender o anticorpo como definido na reivindicação 1 a 3 ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 4 a 8.

15. Kit de diagnóstico de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por ainda compreender instruções de uso.

16. Kit de diagnóstico de acordo com a reivindicação 14 e 15, caracterizado por ainda compreender um meio de detecção do complexo

antígeno/anticorpo, o qual pode compreender um gerador de sinal, capaz de gerar um sinal detectável.

17. Kit para tratamento de infecções fúngicas, caracterizado por compreender

(i) anticorpo como definido na reivindicação 1 a 3 ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 4 a 8; e

(ii) agente antifúngico,

(iii) Instruções para uso dos componentes em combinação.

18. Método para o tratamento de infecções fúngicas, caracterizado por compreender a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo como definido na reivindicação 1 a 3 ou a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 4 a 8 em um indivíduo.

19. Anticorpo como definido na reivindicação 1 a 3 ou composição como definida em qualquer uma das reivindicações 4 a 8, caracterizado por ser para uso no tratamento de infecções fúngicas em um indivíduo.

Figura 1

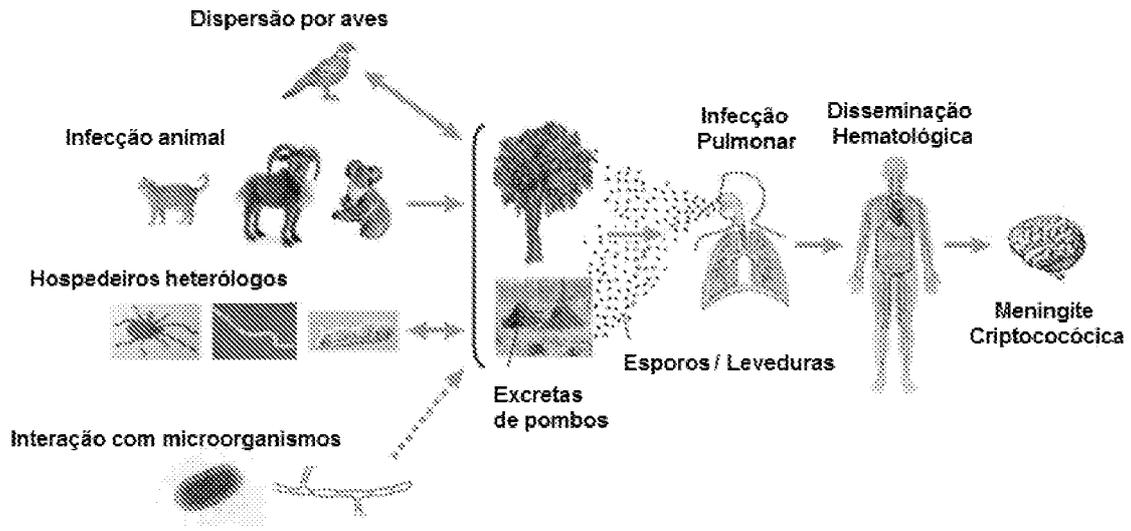


Figura 2

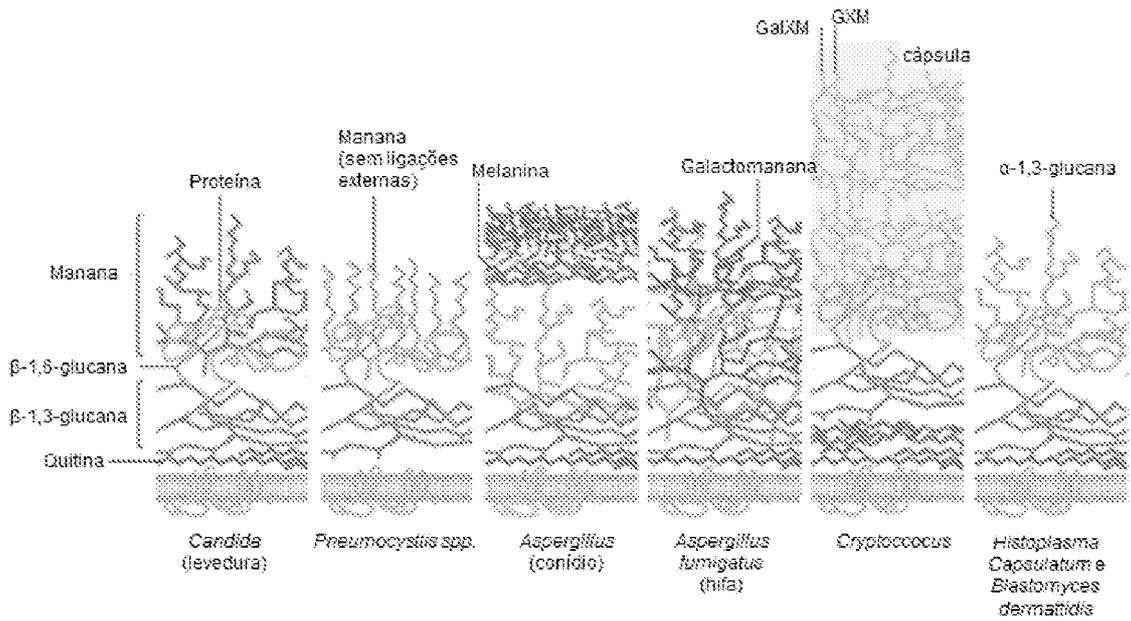


Figura 3

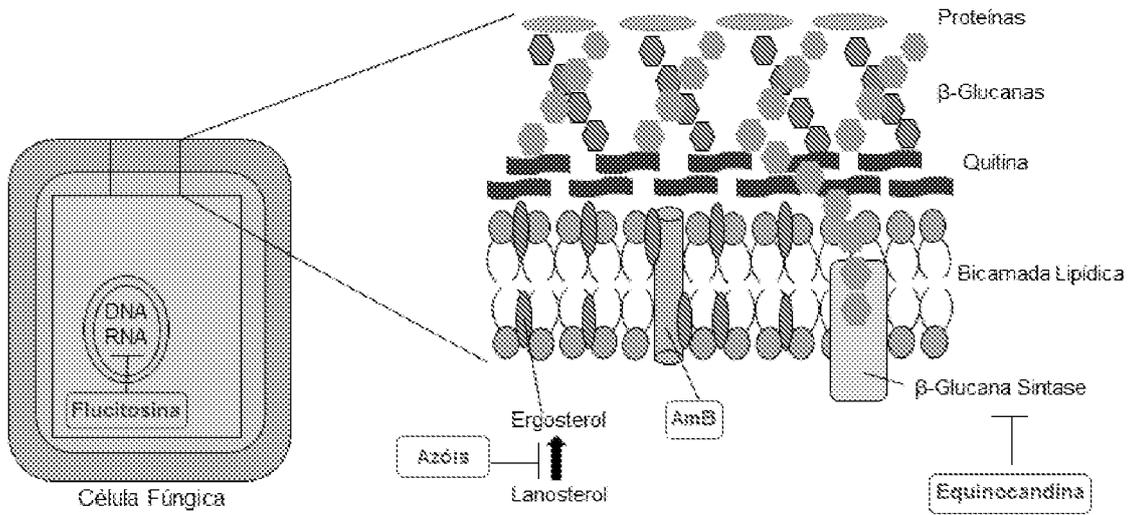


Figura 4

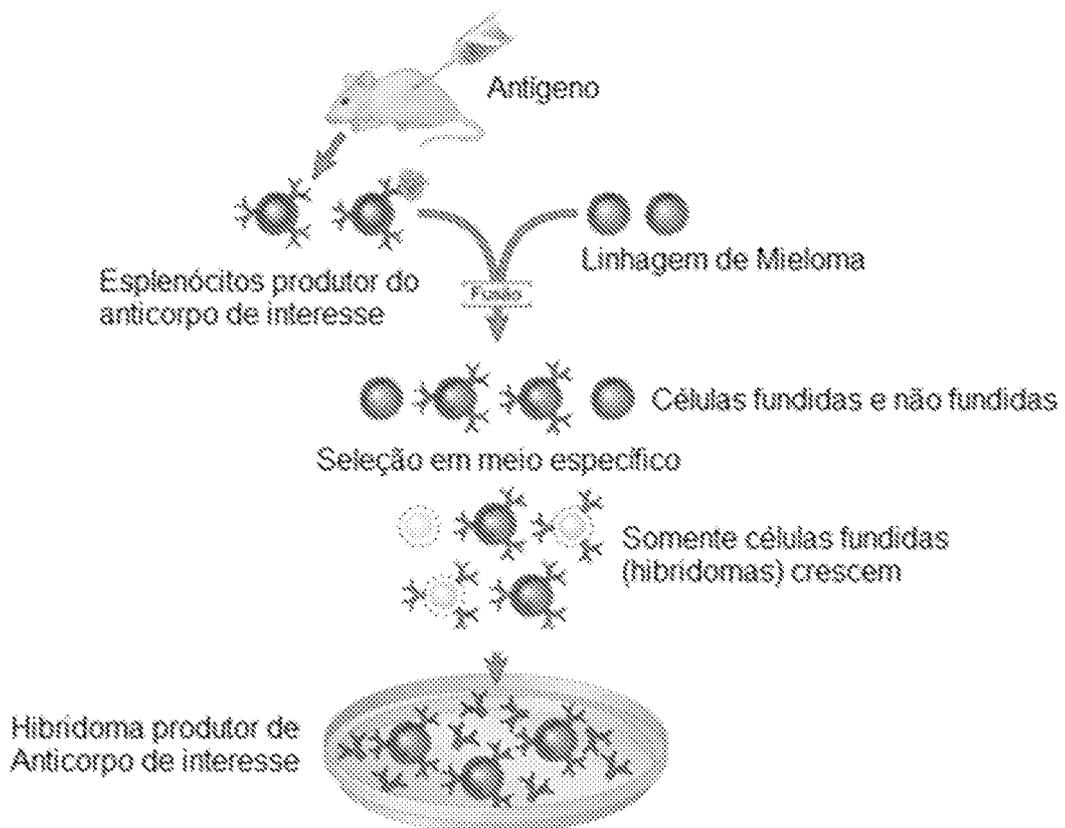


Figura 5

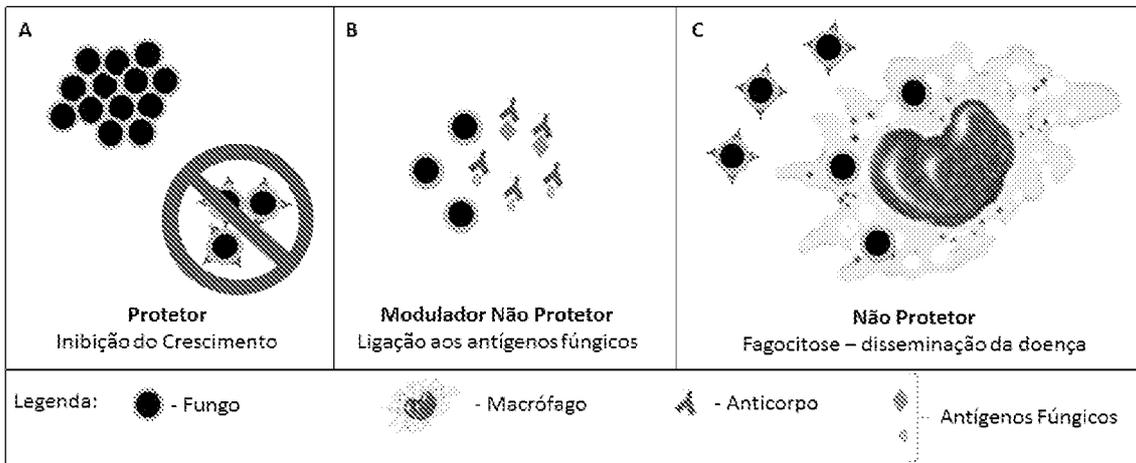


Figura 6

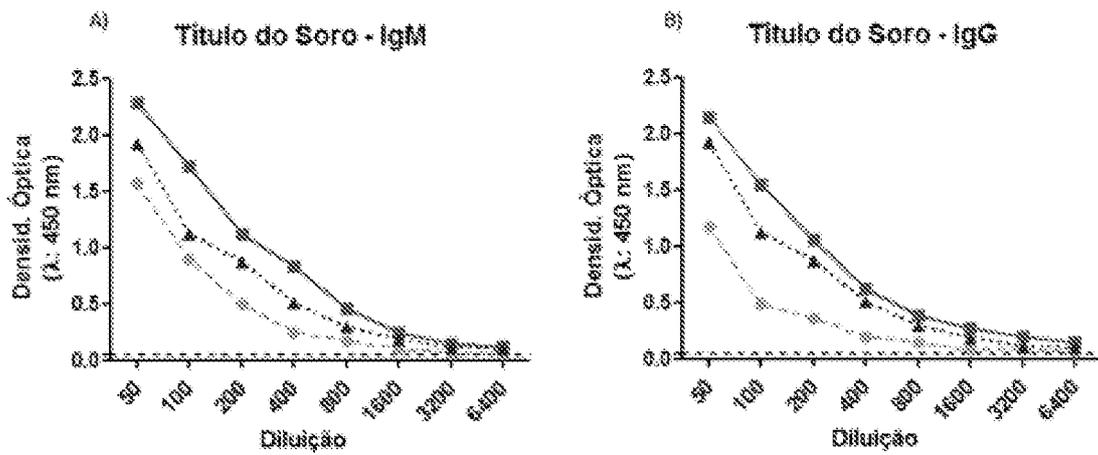


Figura 7

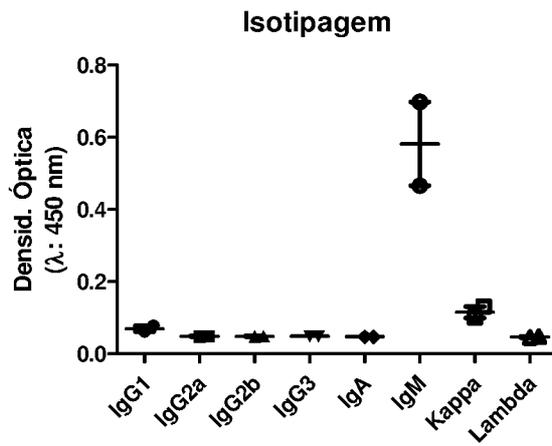


Figura 8

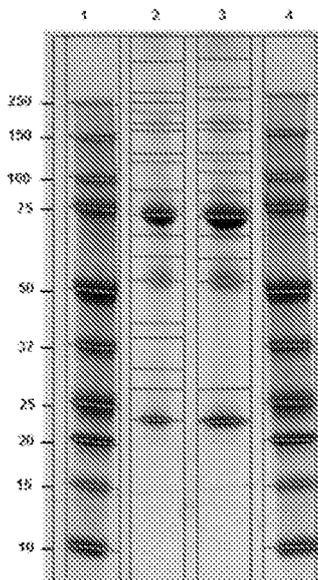


Figura 9

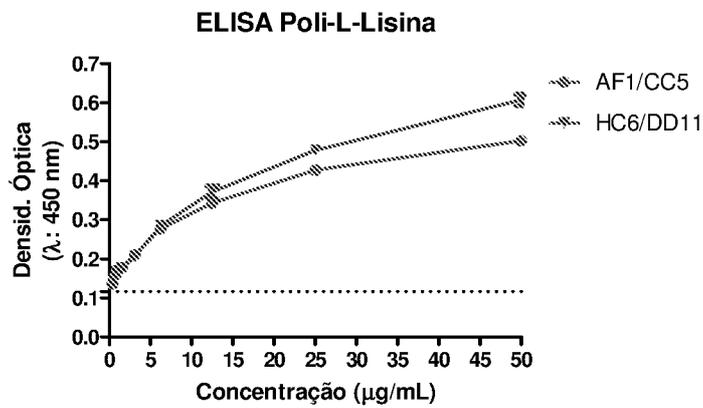


Figura 10

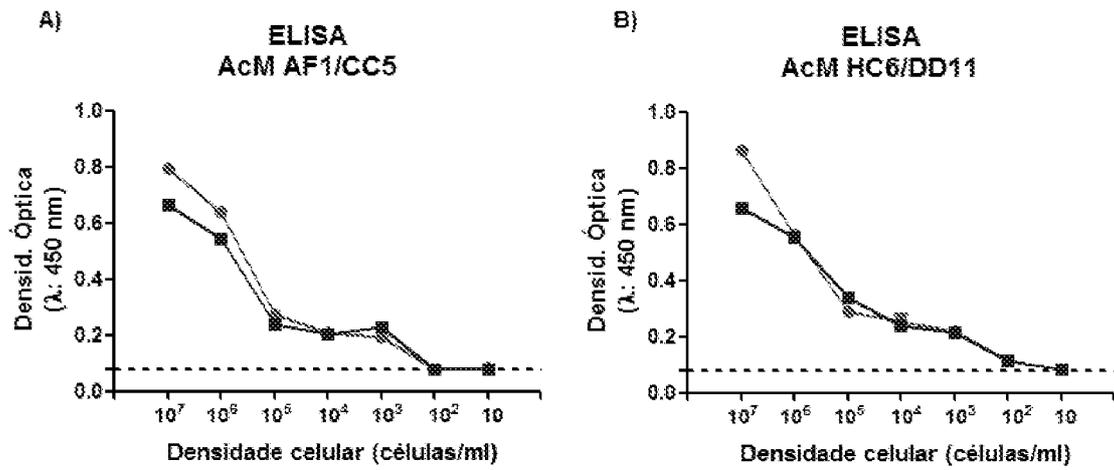


Figura 11

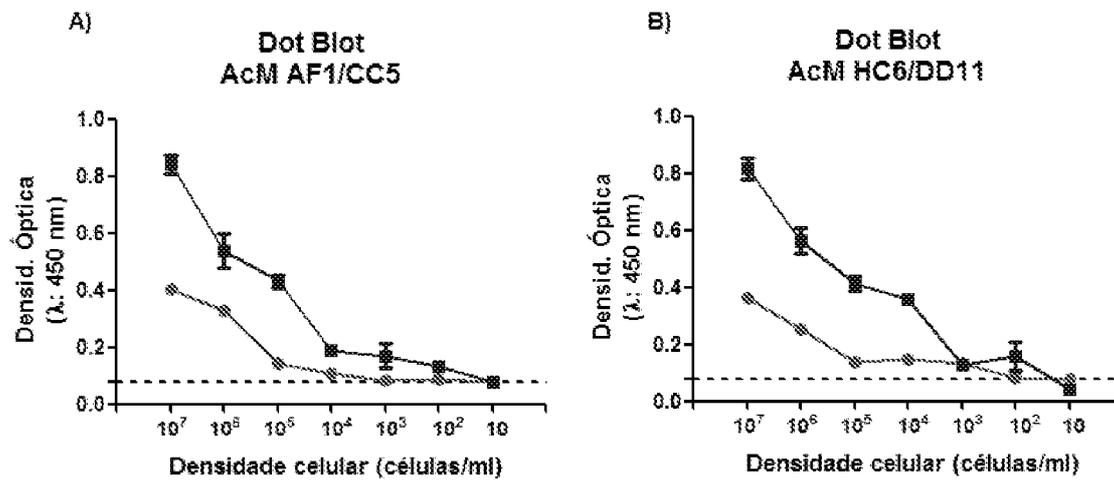


Figura 12

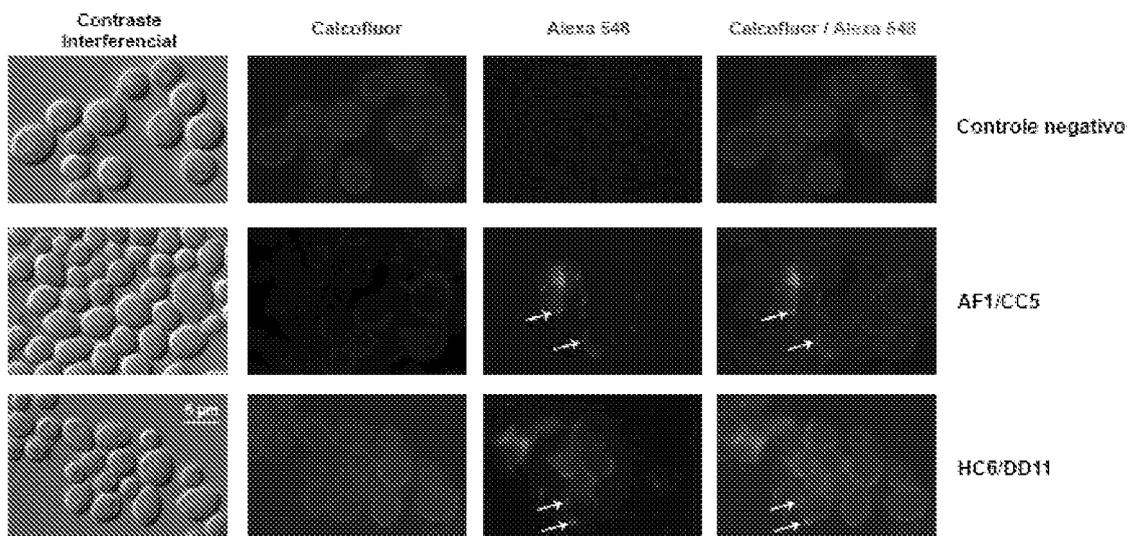


Figura 13

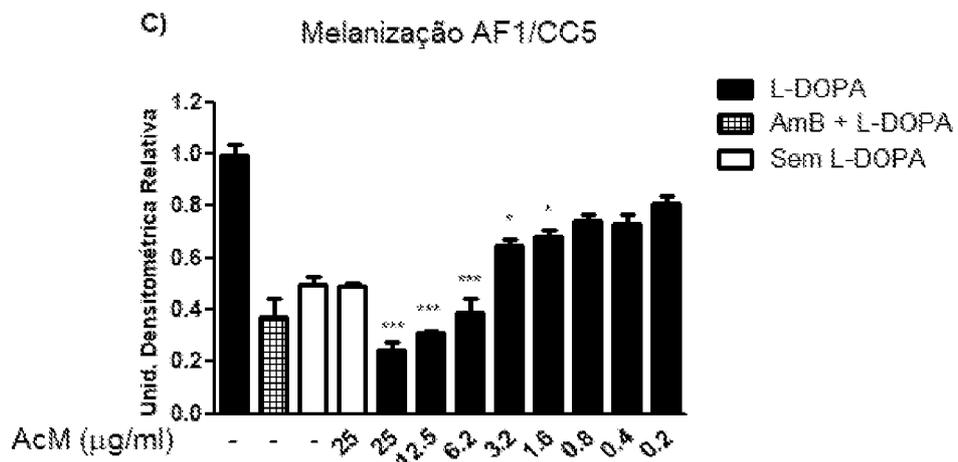
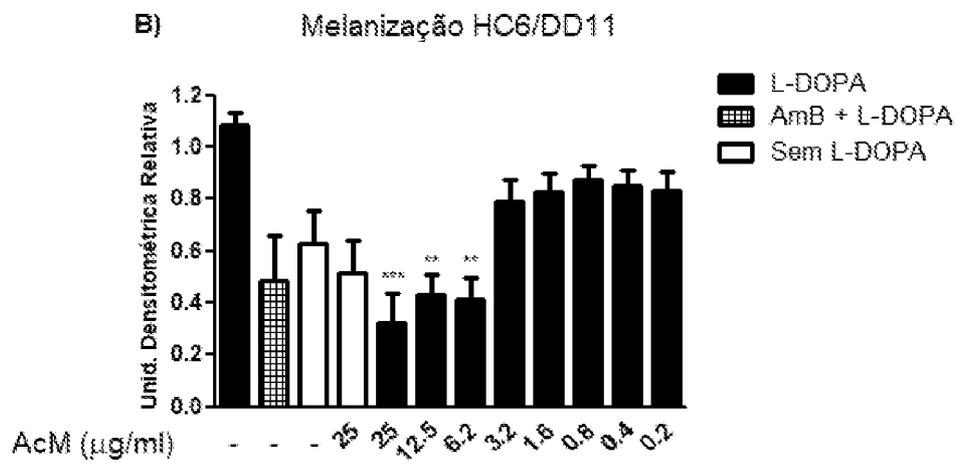
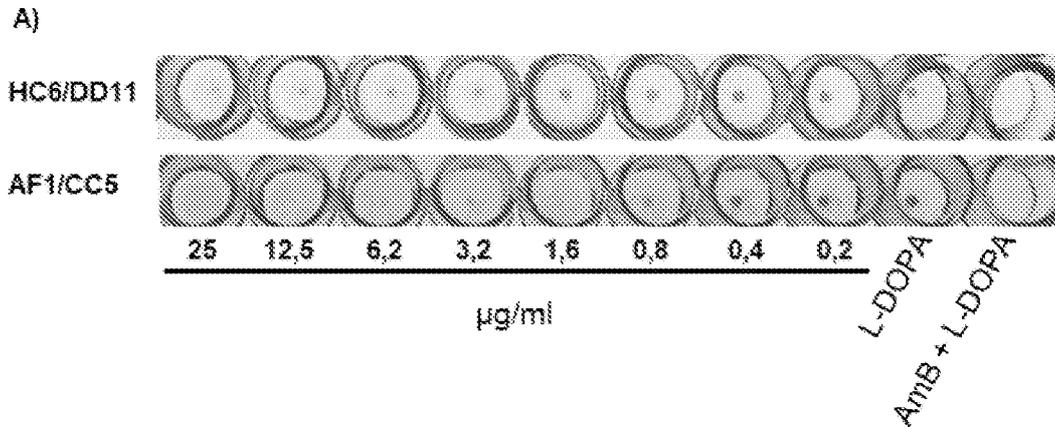


Figura 14

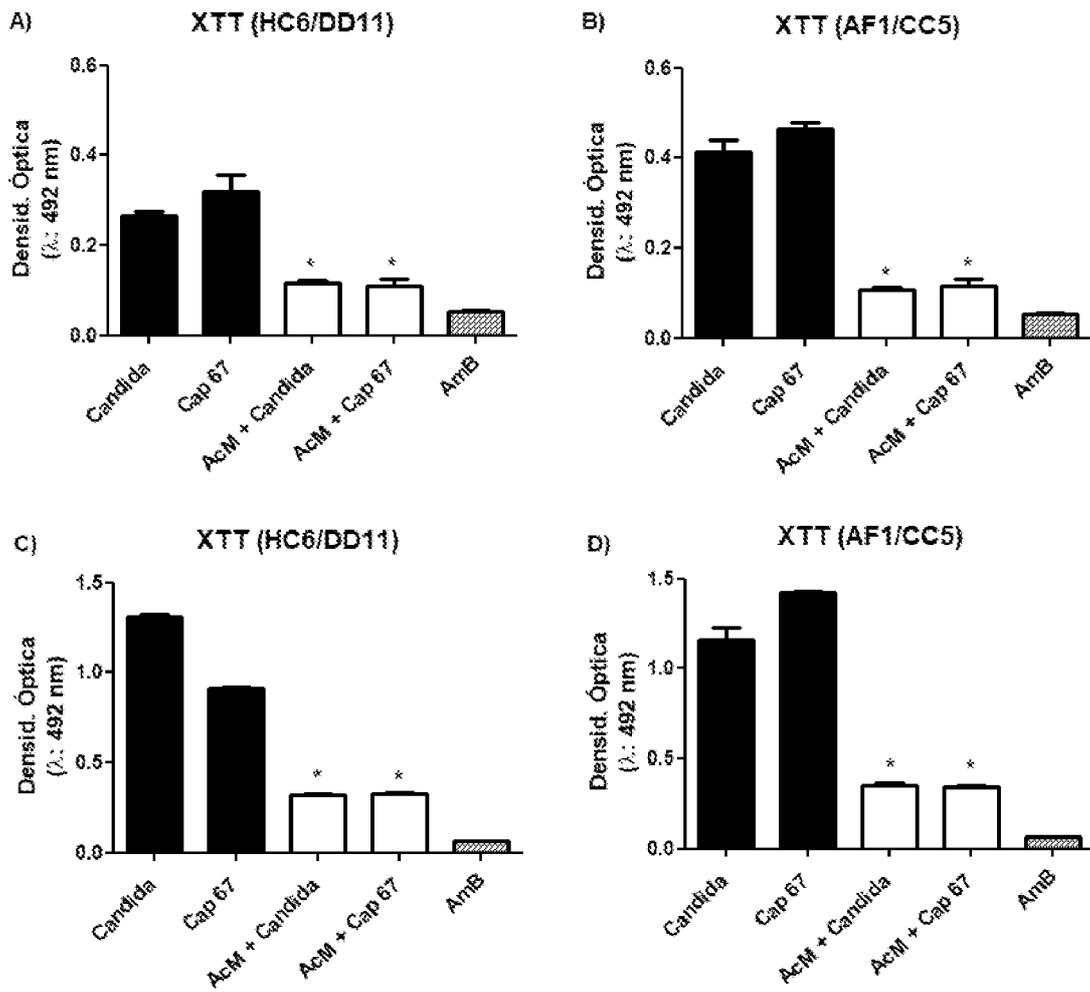


Figura 15

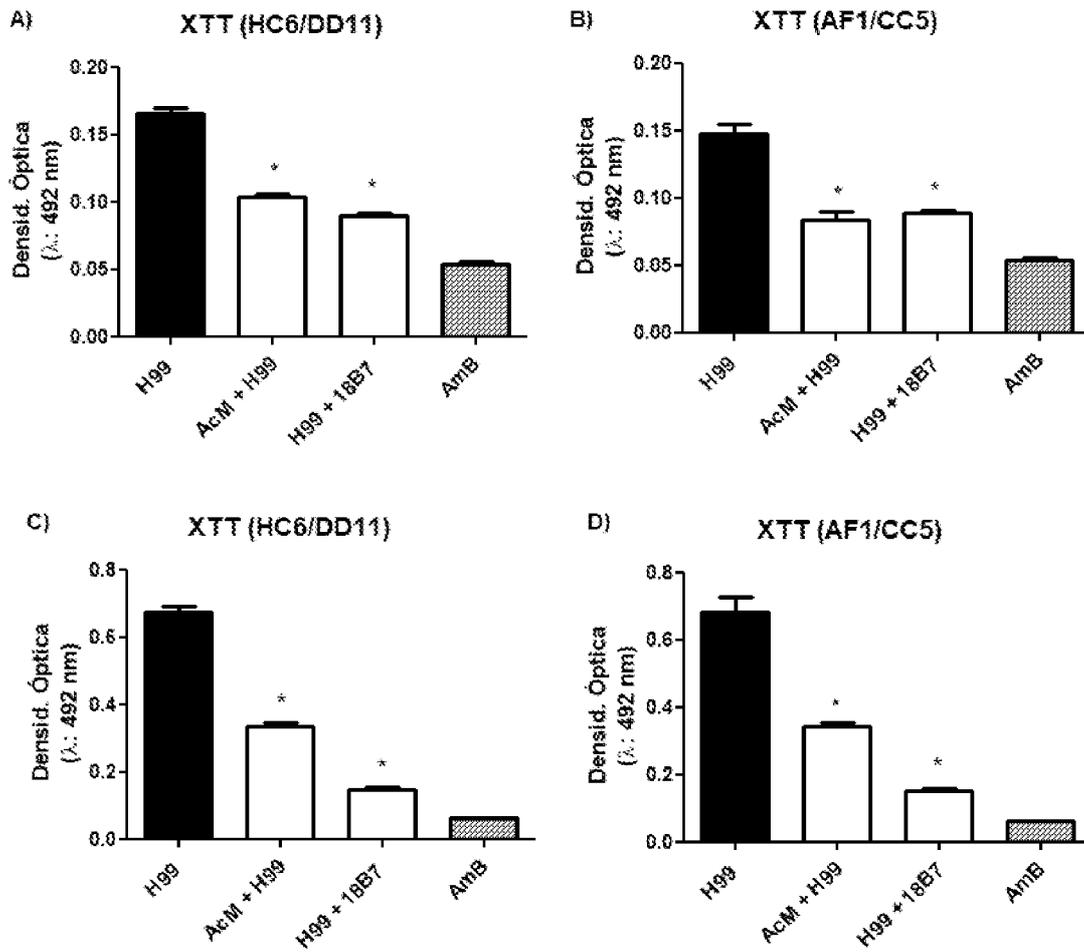


Figura 16

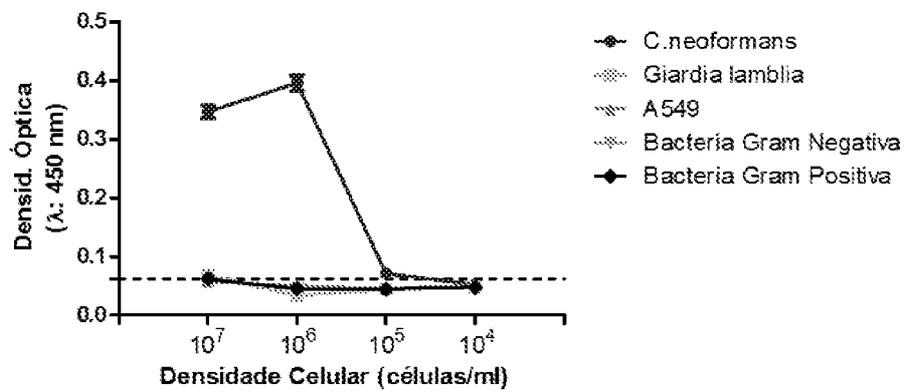
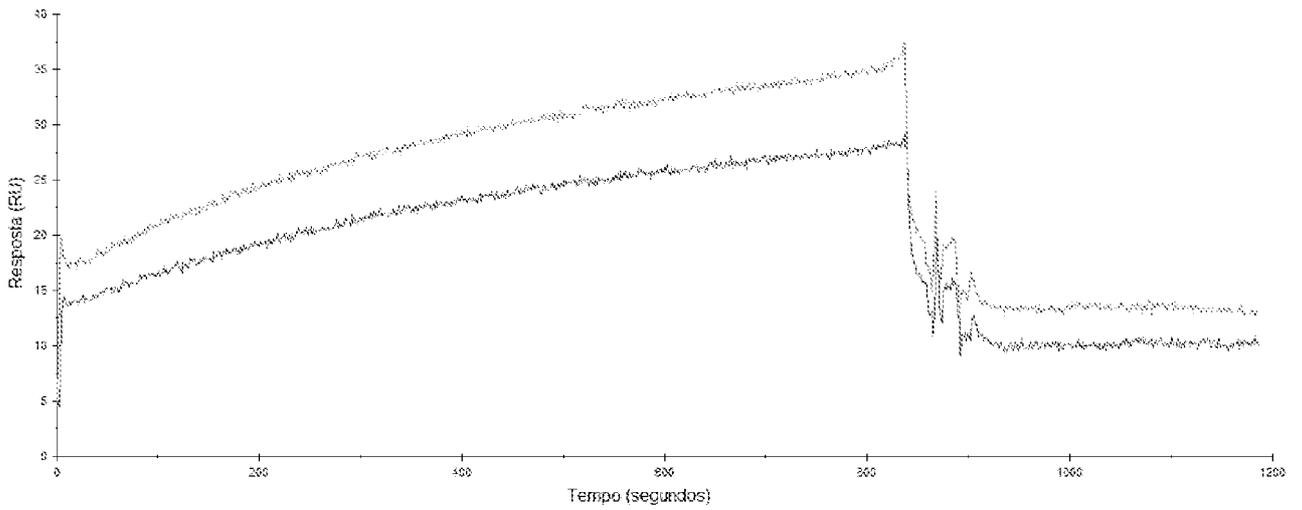


Figura 17



B)

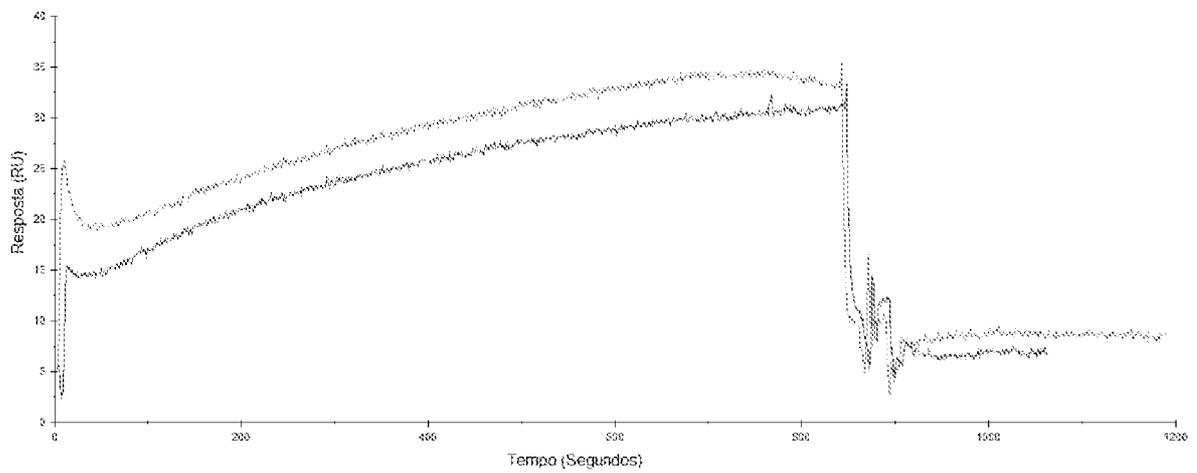


Figura 18

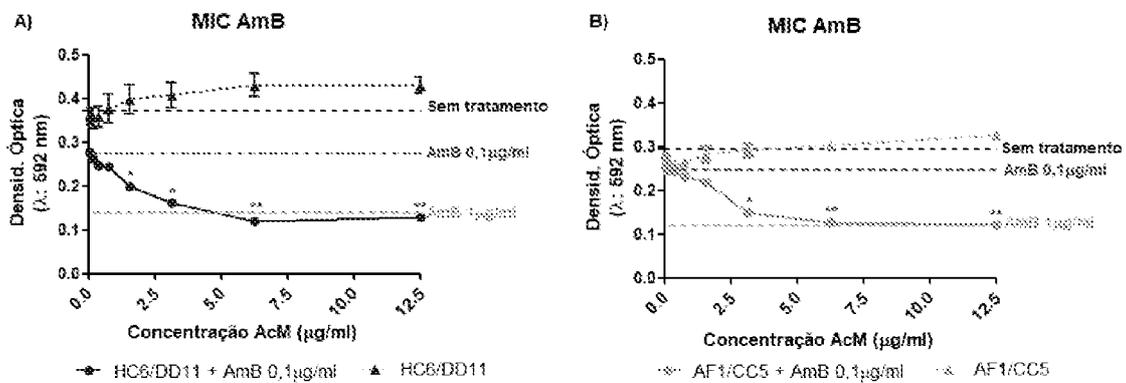


Figura 19

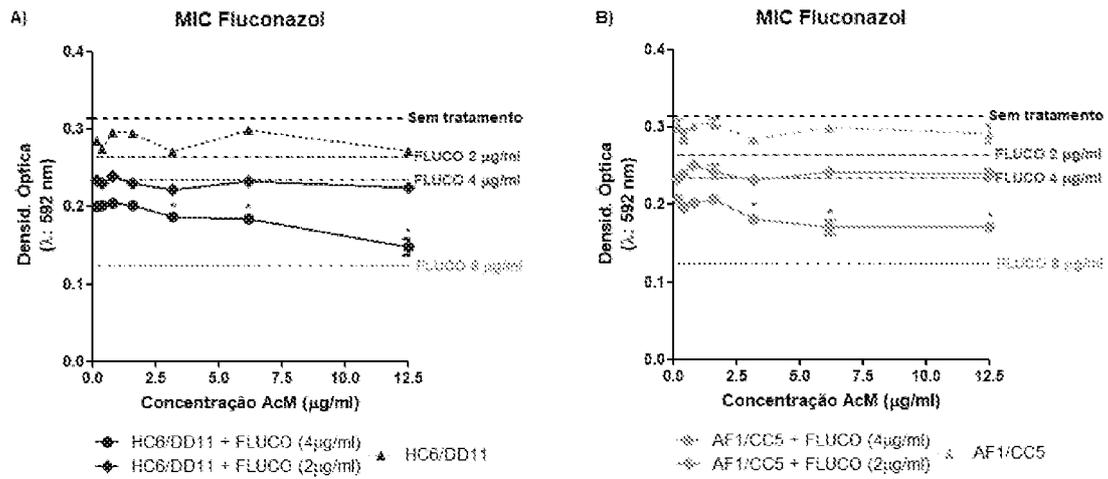


Figura 20

Curva de Sobrevida

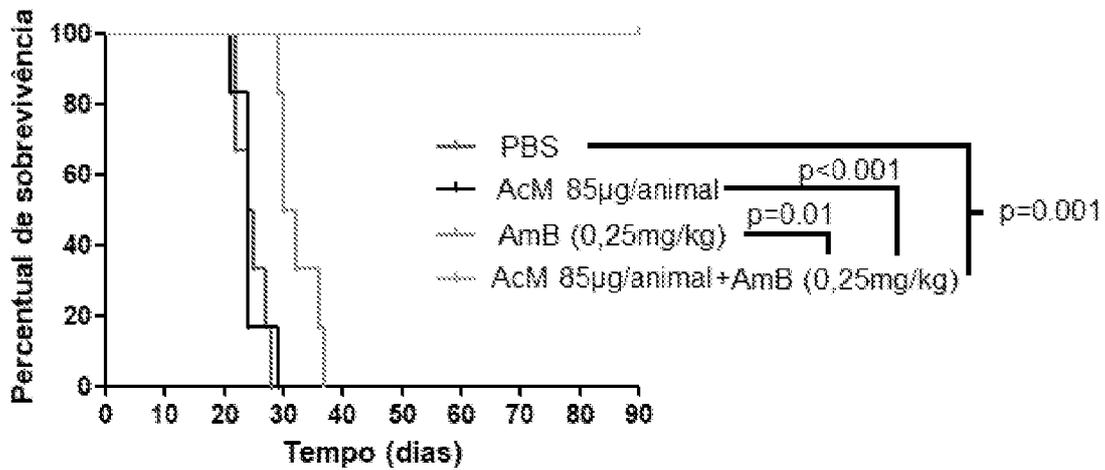


Figura 21

