



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

(21) BR 102017020980-6 A2



(22) Data do Depósito: 29/09/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 16/04/2019

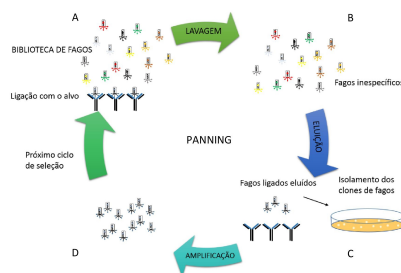
(54) Título: SEQUÊNCIA PEPTÍDICA MIMÉTICA DE AFLATOXINA APLICADA COMO IMUNÓGENO

(51) Int. Cl.: C07K 7/08; A61K 38/10; A61P 39/00.

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

(72) Inventor(es): CARLA YOKO TANIKAWA DE ANDRADE; LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA; JULIANA FERREIRA DE MOURA; LUIZ FELIPE CARON; ISABEL BIASI YAMANAKA.

(57) Resumo: A presente invenção está relacionada com o campo técnico da biotecnologia, sendo caracterizada por compreender a sequência aminoacídica QTDL DY L H P L I N S W N capaz de induzir a produção de anticorpos específicos que reconhecem a aflatoxina B1. Com o objetivo de substituir conjugados de aflatoxina em imunizações e propor um modelo de imunização contra a toxina, foi obtido o imunógeno baseado no mimotopo, i.e. peptídeo mimético de aflatoxina expresso na superfície de bacteriófagos. O bacteriófago recombinante 3P30 foi selecionado pela técnica de phage display (Fig. 1, 2 e 3) e exibiu habilidade de ligação específica ao seu alvo cognato, anticorpo anti-AFB1 (Fig. 4), quando comparado a ligantes irrelevantes (Fig. 5), demonstrando perfil dose dependente (Fig. 6). Em ensaio de imunização, o mimotopo expresso em fago e o peptídeo sintetizado quimicamente foram capazes de induzir anticorpos anti-peptídeo que reconhecem a aflatoxina (Fig. 7). Esta estratégia comprova o mimetismo entre o peptídeo e a toxina, permitindo a aplicação do peptídeo mimético de aflatoxina para o desenvolvimento de vacinas.



SEQUÊNCIA PEPTÍDICA MIMÉTICA DE AFLATOXINA APLICADA COMO IMUNÓGENO

Campo da Invenção

[001]. O campo técnico da presente invenção está relacionado com a biotecnologia, em particular ao peptídeo mimético de aflatoxina e sua aplicação como imunógeno para o desenvolvimento de vacinas.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. Aflatoxina é um metabólito tóxico produzido por fungos do gênero *Aspergillus*. Caracteriza-se como molécula de baixa massa molecular não imunogênica (i.e. hapteno) que induz a doença aflatoxicose em humanos e animais domésticos (WHO, 2002). Notavelmente, 4,5 bilhões de pessoas de países em desenvolvimento são expostas cronicamente a altas quantidades de aflatoxinas, sendo que a ingestão de aflatoxinas durante um longo período, mesmo em baixas concentrações, eleva significativamente o risco de carcinoma hepatocelular e tumores extra-hepáticos (GNONLONFIN *et al.*, 2013). Em animais domésticos, parâmetros de produtividade, como ganho de peso, conversão alimentar, mortalidade e condenações ao abate, são afetados negativamente quando grãos contaminados com aflatoxinas são fornecidos pela ração (WHO, 1993).

[003]. A vacinação para proteção contra aflatoxicose foi âmbito de estudo em aves comerciais (WILKINSON *et al.*, 2003) e vacas leiteiras (POLONELLI *et al.*, 2011), utilizando conjugados de aflatoxina como imunógeno vacinal. Entretanto, devido à baixa imunogenicidade da toxina e ao risco de reversão de toxicidade, a aflatoxina pode não representar um modelo ideal de imunógeno para vacinação. A substituição da toxina por um antígeno mimético constitui uma das estratégias propostas pela técnica de *phage display* (GÁLAN *et al.*,

2016). Esta estratégia reflete o refinamento da tecnologia, onde peptídeos expressos por fagos, ligantes de anticorpo monoclonal, são gerados para o propósito de imunização com o objetivo de induzir anticorpo anti-peptídeo que também é capaz de reconhecer o antígeno nativo (HENRY *et al.*, 2015). Desta forma, a partir da sequência peptídica mimética de aflatoxina pode ser produzido um imunógeno vacinal capaz de induzir a produção de anticorpos específicos sem exposição à toxina, evitando efeitos tóxicos indesejáveis.

Descrição da abordagem do problema técnico

[004]. A presente invenção é um peptídeo que mimetiza o epítopo da aflatoxina reconhecido pelo anticorpo anti-aflatoxina. A técnica de *phage display* permite a seleção de bacteriófagos que expressam peptídeos recombinantes com afinidade por uma molécula alvo (SCOTT & SMITH, 1990). Caso a molécula empregada para a biosseleção frente à biblioteca de fagos seja um anticorpo anti-aflatoxina, são adquiridos peptídeos com afinidade pelo local de ligação da aflatoxina ao anticorpo, ou seja, os peptídeos mimetizam a afinidade específica da aflatoxina com a região variável do anticorpo. Desta forma, esses peptídeos podem ser utilizados em imunizações e induzir a produção de anticorpos anti-aflatoxina, semelhantes ao anticorpo utilizado como molécula alvo na técnica de *phage display*, mas sendo produzido sem o contato com a própria toxina.

[005]. Compreende o ineditismo da presente invenção o imunógeno constituído por um peptídeo mimético capaz de induzir a produção de anticorpos específicos que reconhecem a aflatoxina. Estudos anteriores com peptídeos miméticos de aflatoxina tiveram como objetivo a substituição da toxina em imunodiagnósticos. THIRUMALA-DEVI *et al.* (2001), LI *et al.* (2012) e WANG *et al.* (2013) obtiveram peptídeos miméticos de aflatoxina, mas não buscaram demonstrar o desempenho destes peptídeos em imunizações. Visto que

apresentavam objetivos díspares do presente estudo, os peptídeos obtidos entre os estudos são considerados diferentes entre si.

[006]. Apesar da importância de estudos anteriores, buscando a retirada da toxina como reagente de imunoenaios, a técnica de *phage display* permite que peptídeos miméticos selecionados possam induzir anticorpos anti-peptídeo que reconhecem a própria aflatoxina. Esta estratégia representa a comprovação do mimetismo entre o peptídeo e a toxina, permitindo a aplicação do peptídeo mimético de aflatoxina para o desenvolvimento de vacinas.

Descrição detalhada da Invenção

[007]. A técnica de *phage display* consiste na realização de ciclos de seleção (*pannings*) para triagem de bibliotecas de fagos expressando peptídeos randômicos na superfície viral (BONNYCASTLE *et al.*, 1996). Quatro bibliotecas expressando peptídeos de 8-mer (LX-4), 12-mer (XCX₈CX), 15-mer (X15) e 17-mer (C₈XC₈) foram expostas à molécula alvo – anticorpo monoclonal anti-aflatoxina A9555 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) – adsorvida em superfície sólida (Nunc-Immuno, MaxSorp F96, NUNC Brand Products, Roskilde, Dinamarca), com o objetivo de identificar possíveis ligantes de interesse que mimetizem a referida toxina.

[008]. A sequência aminoacídica é QTDL DY LH PL IN SWN. A estrutura em letras maiúsculas está padronizada por convenção internacional onde os 20 resíduos de aminoácidos primários são designados por um símbolo de uma única letra, a saber, Q representa resíduo de glutamina, T de treonina, D aspartato, L leucina, Y tirosina, H histidina, P prolina, I isoleucina, N asparagina, S serina, e W triptofano.

[009]. A presente invenção também está relacionada à seguinte sequência nucleotídica que codifica a sequência peptídica acima: CAG ACT GAT TTG GAT TAT CTT CAT CCT CTG ATT AAT TCG TGG

AAT, onde C representa citosina, A representa adenina, G representa guanina e T representa timina.

[010]. Os ciclos de seleção (*pannings*) foram realizados conforme descrito anteriormente (SCOTT & SMITH, 1990; LUNDER *et al.*, 2008), com algumas modificações. Em fase sólida, 10 µg/µL de anticorpo monoclonal anti-AFB1 diluído em tampão carbonato (100 mM NaHCO₃, pH 8,6) foram incubados por 16 horas a 4°C. Após cinco lavagens com tampão TRIS salino contendo Tween 0,05% - TBS-T 0,05% (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5), os poços foram saturados com solução de bloqueio (TBS suplementado com 3% albumina sérica bovina) por 1 h a 37°C, seguido por cinco lavagens com TBS-T 0,05%. Para a seleção de afinidade, uma alíquota das bibliotecas (1×10^{11} *transduction units* (TU) por mL) diluída em TBS-T 0,05% a um volume final de 100 µL por poço foi distribuída na placa saturada. Após incubação por 16 h a 4°C, os poços foram intensamente lavados para remover eficientemente fagos não ligados e fagos inespecíficos. O procedimento incluiu 25 lavagens com TBS-T 0,2% e quatro lavagens com solução de eluição (0,1 M glicina-HCl, pH 2,2), adicionando 200 µL por poço sob agitação em agitador orbital por 5 minutos a 50 rpm. Fagos ligantes foram obtidos com solução de eluição e sonicação a 50 Hz por 10 minutos a 25°C (LUNDER *et al.*, 2008). A solução eluída foi recuperada e imediatamente neutralizada com solução TRIS-HCl (1 M Tris-HCl, pH 9,0) para posterior titulação em *Escherichia coli* K91 fase log, amplificação (aproximadamente 10^{12} TU/mL) e precipitação com solução de polietilenoglicol (PEG) 8000. Por dois ciclos de seleção subsequentes, quantidades reduzidas de anticorpo monoclonal (1 e 0,1 mg/mL para o segundo e terceiro *pannings*, respectivamente) foram utilizadas com o objetivos de enriquecer a afinidade dos fagos selecionados.

[011]. Para avaliar a antigenicidade dos peptídeos selecionados por *phage display*, o seguinte ELISA indireto foi conduzido. Colônias individualizadas contendo fagos de cada panning foram selecionadas e amplificadas por 16 h a 37°C em meio LB com 20 µg/mL de tetraciclina. Os sobrenadantes contendo fagos foram obtidos por centrifugação (1.600 x g, 20 minutos, 4°C) e analisados por afinidade com anticorpos específicos e irrelevantes. Placas de microtitulação foram adsorvidas por 16 horas a 4°C com anticorpo monoclonal ou policlonal anti-AFB1 (A8679, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) ou ainda com cada ligante irrelevante – BSA, anticorpo monoclonal mAb7 (ALVARENGA *et al.*, 2003), IgG de coelho não-imunizado ou IgG de camundongo não-imunizado. Após lavagem (PBS, 0,05% Tween 20) e bloqueio (PBS, 2% caseína), 10^{11} , 10^{10} , 10^9 e 10^8 TU/mL de fagos expressando peptídeos recombinantes ou ainda fago silvestre foram adicionados e incubados por 1 h a 37°C. Entende-se por fago silvestre aquele idêntico ao presente nas bibliotecas, mas que não expressa peptídeos exógenos na superfície viral. Para verificação da interação anticorpo-fago, a placa foi incubada por 1 h a 37°C com anticorpo anti-M13 conjugado à peroxidase, produzido em camundongo (GE Health Care, Buckinghamshire, Inglaterra), diluído 1:5.000 em solução de incubação (PBS, 0,25% caseína, 0,05% Tween 20). Complexos antígeno-anticorpo foram determinados por atividade da peroxidase usando O-fenilenodiamina (OPD) como cromógeno e peróxido de hidrogênio 30% como substrato em tampão citrato (50 mM Na_2HPO_4 , 27 mM ácido cítrico, pH 5,0) para medição da absorbância a 490 nm.

[012]. Os fagos com maior reatividade e especificidade (absorbância ao menos duas vezes maior que o fago silvestre) foram selecionados para sequenciamento de DNA e subsequente identificação da sequência peptídica inserida nos fagos. Aproximadamente 100 ng de DNA de fita simples foram purificadas

usando kit QIA prep Spin M13 (Qiagen, Alemanha). Reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o método de Sanger, usando kit BigDye Terminator v3.1 (Thermo Scientific, Waltham, EUA) para sequenciamento automático com sequenciador Applied Biosystems 3130 (Thermo Scientific, Waltham, EUA). O iniciador reverso 5' – GCT CAG GGG AGT AAA CAG GA – 3' (Exxtend, Campinas, Brasil) foi usado para sequenciamento. A sequência peptídica de seis clones de fagos validados – 3P8, 3P13, 3P19, 3P20, 3P23 e 3P30 – foi deduzida usando servidor Expasy (www.expasy.org) e analisada com os programas HHPred, Pepdraw, Pepsearch, PeptideMass e ProtParam para caracterizar a sequência. Os respectivos clones demonstraram sequências nucleotídicas idênticas, sendo correspondente a peptídeos selecionados da biblioteca X15, que expressa peptídeos lineares de 15 resíduos.

[013]. A sequência peptídica do mimotopo de aflatoxina com massa molar de 1.825 Da e ponto isoelétrico teórico de 3,91 exibe resíduos hidrofóbicos não carregados, como lisina, prolina e triptofano, que contribuem para o aumento da hidrofobicidade – maior que 40% - e expressa parcial solubilidade em água. A comparação com sequências de mimotopos de aflatoxina previamente selecionadas por anticorpos anti-AFB1 (THIRUMALA-DEVI *et al.*, 2001, LI *et al.*, 2012 e WANG *et al.*, 2013) não revelou homologia em relação à sequência aminoacídica obtida, assim como não foram detectados domínios conservados putativos em bancos de dados disponíveis por BLAST 2.7.0 (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Thirumala-Devi *et al.* (2001) e Liu *et al.* (2012) sugerem a sequência consenso ‘...CYMDXC...’ e ‘HXXXXPXH’, respectivamente, para sequência de mimotopos selecionados (sendo X qualquer resíduo de aminoácido). Wang *et al.* (2013) obtiveram cinco sequências diferentes, obtendo as sequências consenso ‘PHPWNP’ e ‘TXHRNW’. Os aminoácidos mais comuns foram prolina (P), triptofano

(W) e histidina (H), revelando apenas similaridade de interação de diferentes anticorpos anti-AFB1 com a aflatoxina.

[014]. O peptídeo foi sintetizado por Aminotech (São Paulo, Brasil), com pureza igual ou superior a 95% para conjugação por extensão C-terminal de cisteína a BSA ou ovalbumina (OVA), conforme descrito por Capelli-Peixoto *et al.* (2011). Desta forma, o peptídeo conjugado a BSA foi utilizado como imunógeno.

[015]. A imunização de camundongos com fago foi realizada essencialmente como descrito por Galfré *et al.* (1996), tendo aprovação do comitê de ética da Universidade Federal do Paraná, processo número 23075.073175/2015. Resumidamente, o clone de fago 3P30 (1×10^{11} TU em 100 μ L de TBS) foi injetado via subcutânea em camundongos Swiss, fêmeas de 3-4 semanas de idade. Grupos de camundongos também foram injetados com BSA conjugado a AFB1 (A6655, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) ou peptídeo sintético (25 μ g dissolvido em tampão fosfato salino, PBS 50 mM, pH 7,4). Os camundongos dos grupos controles foram injetados com fago silvestre ou fago irrelevante 3P25, escolhido aleatoriamente do terceiro ciclo de seleção. Todos os grupos foram compostos de quatro animais e receberam suspensões (1:1) de fago com adjuvantes: adjuvante completo de Freund para a primeira imunização e adjuvante incompleto de Freund para imunizações subsequentes. Duas imunizações adicionais foram realizadas em intervalos de 2-3 semanas, seguido de imunização final após uma semana. Os camundongos foram sangrados sete dias após a terceira e quarta imunizações para a coleta de soro. Os soros foram mantidos a -20 ° C até a avaliação da resposta imune induzida pela imunização. Para isto foi realizado um ELISA indireto para determinação de anticorpos anti-peptídeo e anti-AFB1.

[016]. Placas de microtitulação (Nunc-Imuno, MaxiSorp F96, Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram revestidas a 4°C durante 16 horas com 10 µg/mL de peptídeo sintético acoplado a BSA, AFB1-BSA ou BSA em tampão carbonato, pH 8,6, conforme descrito anteriormente, e foi avaliada a reatividade contra soros de camundongos imunizados com peptídeo conjugado com BSA, AFB1-BSA e clones de fago (3P30, fago irrelevante 3P25 e fago silvestre). Após lavagem, a placa foi incubada por 1 h a 37°C com conjugado anti-IgG murino marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), diluído 1: 4000 em solução de incubação. O título de anticorpos específicos foi derivado da recíproca diluição da amostra correspondendo a OD490 nm $\geq$ 0,05 após correção dos valores de reatividade de BSA. Os resultados são apresentados como título médio $\pm$ desvio padrão por grupo de camundongos imunizados.

Legendas das figuras

[017]. FIGURA 1: Representação esquemática do procedimento de seleção (panning). Bibliotecas de fagos foram selecionadas contra anticorpo anti-AFB1 (A) e após lavagem foram removidos os fagos não ligantes e inespecíficos (B). Os fagos ligados foram eluídos (C), permitindo a recuperação dos clones de fagos específicos, que foram amplificados (D) para serem submetidos ao próximo ciclo de seleção e/ou testados quanto à especificidade.

[018]. FIGURA 2: Enriquecimento e reatividade dos fagos selecionados usando anticorpo anti-AFB1 após três ciclos de seleção. O número de partículas virais recuperadas após cada panning (PI, PII e PIII) e a reatividade contra anticorpo anti-AFB1 são demonstradas como TU (*transduction units*/mL e absorbância (490 nm), respectivamente. A absorbância média do fago silvestre foi subtraída da absorbância de cada panning. Foi observado um enriquecimento significativo da afinidade dos pools de fagos obtidos de cada panning, indicado por

uma redução de 10^2 TU/mL de fagos recuperados entre o primeiro e segundo *pannings*. Em contrapartida, a reatividade dos fagos eluídos aumentou após o terceiro ciclo, sendo oito vezes maior que no segundo ciclo.

[019]. FIGURA 3: *Screening* dos clones de fagos recuperados. Colônias individualizadas contendo fagos de cada *panning* foram amplificadas e analisadas quanto à ligação ao anticorpo específico anti-AFB1 por ELISA. Fagos foram detectados usando anticorpo anti-M13 conjugado à peroxidase. Reatividade demonstrada como absorbância (490 nm) $\pm$ desvio padrão, tendo o fago silvestre como controle. Aproximadamente 82 clones foram randomicamente testados e nove foram ligantes de anticorpo anti-AFB1. Os fagos selecionados apresentaram reatividade ao menos 20 vezes maior que o fago silvestre.

[020]. FIGURA 4: Reatividade de clones de fagos específicos (3P4 a 3P30) e irrelevante (3P25) a 10^{12} TU/mL com anticorpo anti-AFB1, demonstrada como absorbância (490 nm) $\pm$ desvio padrão. A especificidade dos clones foi determinada como valores de absorbância com anticorpos monoclonal e policlonal anti-AFB1. Esta especificidade não foi observada com o fago irrelevante 3P25 ou fago silvestre, indicando que a reatividade ocorre entre o anticorpo e os peptídeos recombinantes fusionados no capsídeo dos fagos específicos.

[021]. FIGURA 5: Reatividade de clones de fagos específicos (3P4 a 3P30) e irrelevante (3P25) a 10^{11} TU/mL com ligantes irrelevantes, demonstrada como absorbância (490 nm) $\pm$ desvio padrão. Nenhum fago demonstrou especificidade por BSA ou anticorpo de camundongo não imunizado. Entretanto, alguns clones (3P4, 3P5 e 3P16) demonstraram reconhecimento inespecífico por anticorpo monoclonal mAb7, anticorpo policlonal de coelho não-imunizado, indicando que estes clones foram menos específicos que outros clones selecionados.

[022]. FIGURA 6: Reatividade de clones de fagos específicos (3P4 a 3P30) e irrelevante (3P25) a 10^{11} , 10^{10} , 10^9 e 10^8 TU/mL com anticorpo monoclonal anti-AFB1, demonstrada como absorbância (490 nm) $\pm$ desvio padrão. Os fagos selecionados exibiram um perfil dose-dependente: a redução da concentração de fagos de 10^{11} a 10^8 TU/mL esteve acompanhada de redução da reatividade com o anticorpo monoclonal anti-AFB1, enquanto nenhuma interferência foi observada com fago irrelevante 3P25 ou fago silvestre. Esse resultado também indica que os peptídeos expressos pelos fagos selecionados representam o sítio de ligação com o anticorpo anti-AFB1.

[023]. FIGURA 7: Imunogenicidade de clones de fagos selecionados e peptídeo sintético. ELISA indireto de título de anticorpos em soro de camundongos imunizados com peptídeo-BSA, AFB1-BSA, fago específico 3P30, fago irrelevante 3P25 ou fago silvestre, demonstrado como média e desvio padrão de título recíproco de cada grupo. Os resultados revelam a presença de anticorpo anti-peptídeo em todos os grupos analisados. Para o grupo imunizado com peptídeo, o título de anticorpo anti-peptídeo foi duas vezes maior comparado com os grupos imunizados com AFB1, 3P30, 3P25 e fago silvestre. O grupo imunizado com AFB1-BSA produziu títulos maiores de anticorpo anti-AFB1. Comprovando o mimetismo do peptídeo, camundongos imunizados com peptídeo-BSA também foram capazes de produzir anticorpos anti-AFB1, apesar de apresentar título menor que o grupo imunizado com AFB1-BSA. Esse resultado destaca a habilidade do peptídeo mimético induzir resposta imune humoral com produção de anticorpo anti-AFB1 sem exposição prévia à própria toxina.

Referências

[024]. WHO, 2002. World Health Organization: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthlene and styrene.

Monograph 82. International Agency for Research on Cancer: Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

[025]. G. J. B. Gnonlonfin, K. Hell, Y. Adjovi, P. Fandohan, D. O. Koudande, G. A. Mensah, *et al.*, A Review on Aflatoxin Contamination and Its Implications in the Developing World: A Sub-Saharan African Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013;53:349-365

[026]. WHO, 1993. World Health Organization: Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monograph 56. International Agency for Research on Cancer: Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

[027]. J. Wilkinson, D. Rood, D. Minior, K. Guillard, M. Darre and L. K. Silbart, Immune response to a mucosally administered aflatoxin B1 vaccine. *Poultry science*. 2003;82:1565-1572

[028]. L. Polonelli, L. Giovati, W. Magliani, S. Conti, S. Sforza, A. Calabretta, *et al.*, Vaccination of lactating dairy cows for the prevention of aflatoxin B1 carry over in milk. *PloS one*. 2011;6:e26777

[029]. A. Galán, L. Comor, A. Horvatić, J. Kuleš, N. Guillemin, V. Mrljak, *et al.*, Library-based display technologies: where do we stand? *Molecular BioSystems*. 2016;12:2342-2358

[030]. K. A. Henry, M. Arbabi-Ghahroudi and J. K. Scott, Beyond *phage display*: non-traditional applications of the filamentous bacteriophage as a vaccine carrier, therapeutic biologic, and bioconjugation scaffold. *Frontiers in microbiology*. 2015;6

[031]. J. K. Scott and G. P. Smith, Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 1990;249:386-390

[032]. K. Thirumala-Devi, J. S. Miller, G. Reddy, D. V. R. Reddy and M. A. Mayo, Phage-displayed peptides that mimic aflatoxin B1 in serological reactivity. *J Appl Microbiol*. 2001;90:330-336

[033]. R. Liu, L. Xu, X. Qiu, X. Chen, S. Deng, W. Lai, *et al.*, An immunoassay for determining aflatoxin B1 using a recombinant phage as a nontoxic coating conjugate. *Journal of Food Safety*. 2012;32:318-325

[034]. Y. Wang, H. Wang, P. Li, Q. Zhang, H. J. Kim, S. J. Gee, *et al.*, Phage-displayed peptide that mimics aflatoxins and its application in immunoassay. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61:2426-2433

[035]. L. L. C. Bonnycastle, J. S. Mehroke, M. Rashed, X. Gong and J. K. Scott, Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *Journal of molecular biology*. 1996;258:747-762

[036]. M. Lunder, T. Bratkovic, U. Urleb, S. Kreft and B. Strukelj, Ultrasound in *phage display*: a new approach to nonspecific elution. *Biotechniques*. 2008;44:893-900

[037]. L. M. Alvarenga, M. S. Martins, J. F. Moura, E. Kalapothakis, J. C. Oliveira, O. C. Mangili, *et al.*, Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. *Toxicon*. 2003;42:725-731

[038]. S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res*. 25:3389-3402.

[039]. J. Capelli-Peixoto, C. Chávez-Olórtegui, D. Chaves-Moreira, J. C. Minozzo, J. Gabardo, K. N. Teixeira, *et al.*, Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis. *Vaccine*. 2011;29:9473-9479

[040]. G. Galfrè, P. Monaci, A. Nicosia, A. Luzzago, F. Felici and R. Cortese, [6] Immunization with phage-displayed mimotopes. *Methods in enzymology*. 1996;267:109-115

REIVINDICAÇÕES

1. **Antígeno mimético de aflatoxina**, caracterizado por possuir a sequência aminoacídica SEQ ID N° 1 que compreende o peptídeo QTDLDY LHPLINSWN.
2. **Sequência peptídica mimética de aflatoxina** caracterizada por, de acordo com a reivindicação 1, na qual i) induz produtos do sistema imunológico, i.e. anticorpos, produzidos contra aflatoxinas; ii) a sequência peptídica SEQ ID N° 1 é codificada pela sequência nucleotídica original SEQ ID N° 2: CAG ACT GAT TTG GAT TAT CTT CAT CCT CTG ATT AAT TCG TGG AAT; iii) obtido por síntese química, o aminoácido C (cisteína) carboxi-terminal interage com o espaçador para conjugação com proteínas carreadoras; iv) obtido biologicamente, cuja informação genética foi inserida em bacteriófago filamentoso selecionado por *phage display*.
3. **Composição imunogênica para aflatoxina**, caracterizada pela sequência peptídica SEQ N° 1 ligada a uma proteína carreadora.
4. **Composição imunogênica para aflatoxina**, caracterizada pela sequência peptídica SEQ N° 1 exposta no capsídeo viral de bacteriófago filamentoso f88.4.
5. **Uso da composição imunogênica para aflatoxina**, caracterizada pelas reivindicações 3 ou 4 como agente indutor de resposta imunológica e por atuar como imunógeno para produção de anticorpos específicos anti-aflatoxina.

DESENHOS

Figura 1

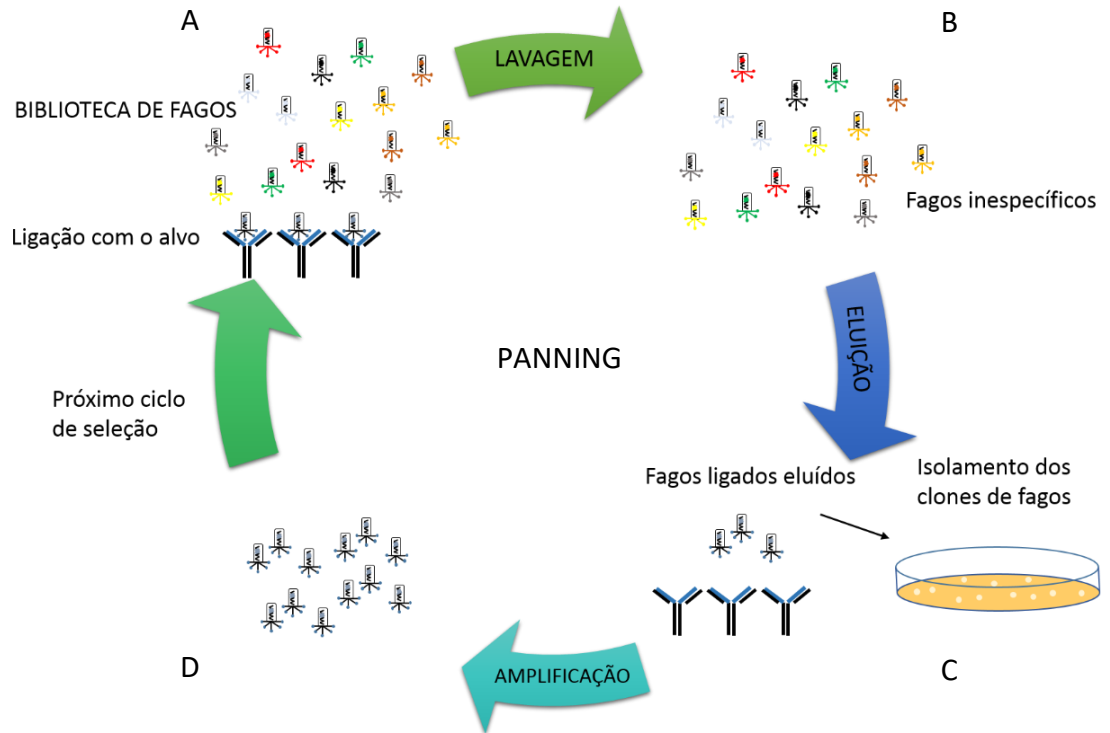


Figura 2

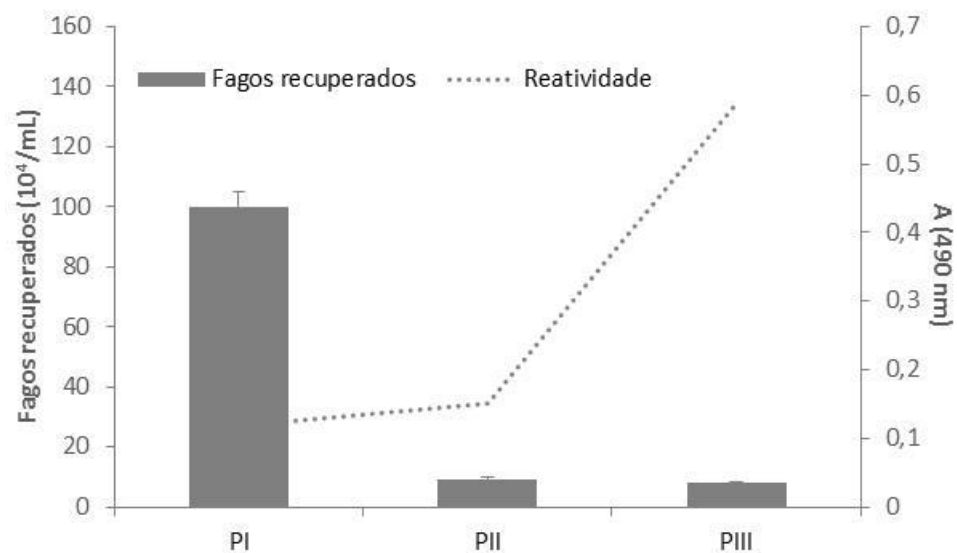


Figura 3

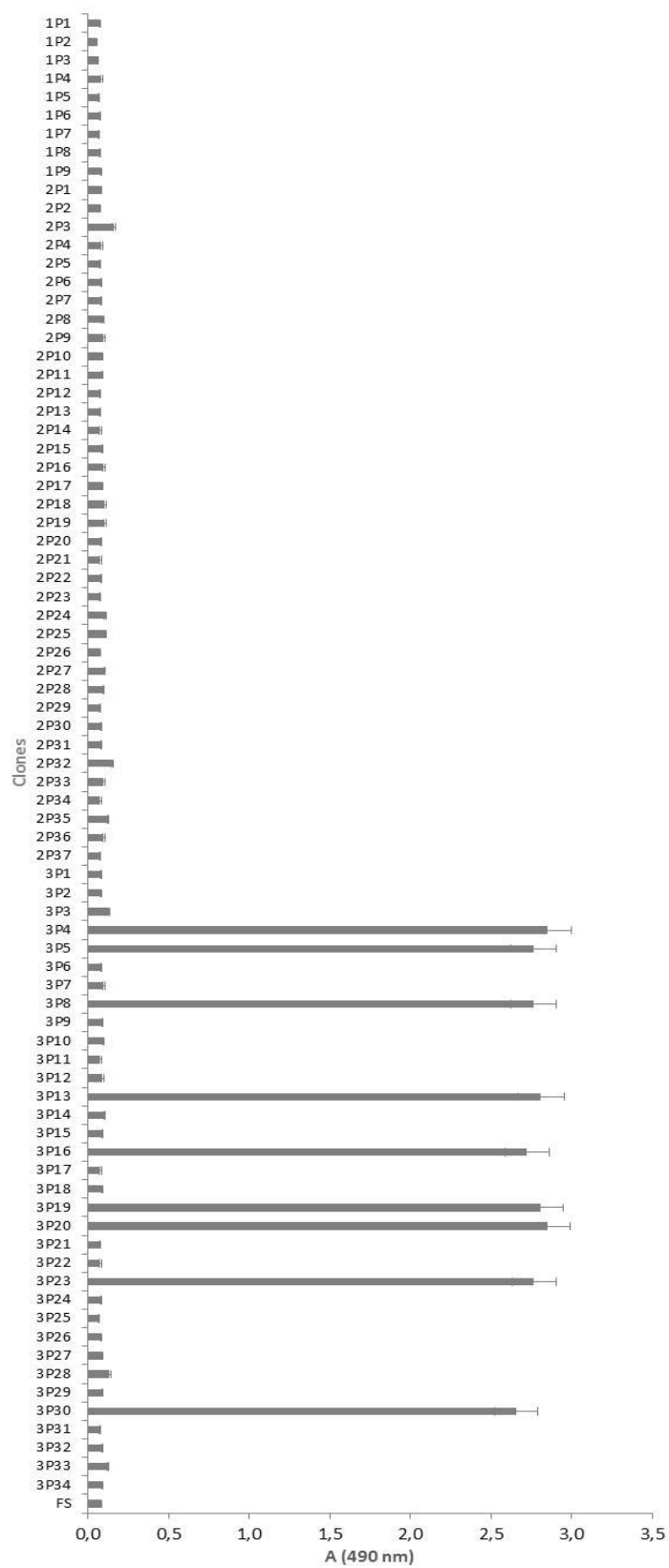


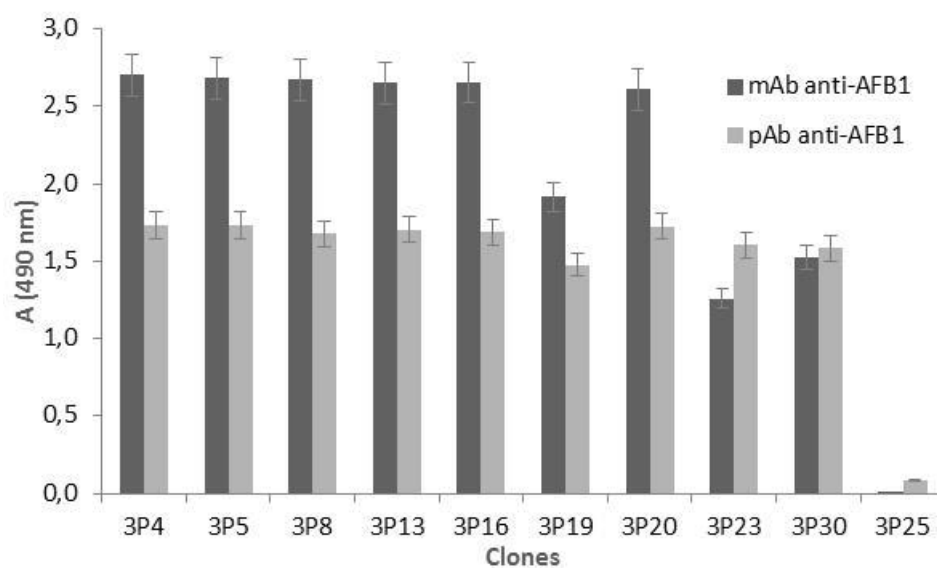
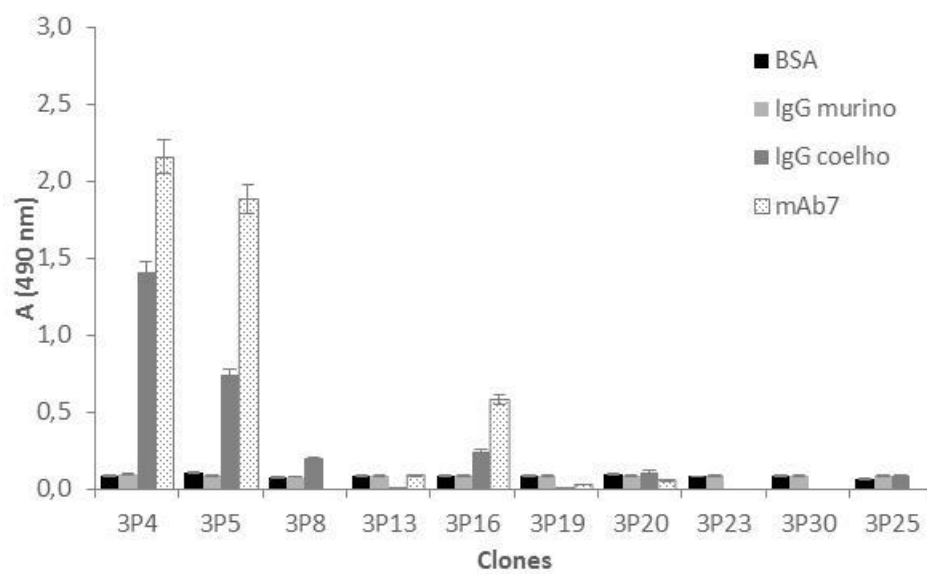
Figura 4**Figura 5**

Figura 6

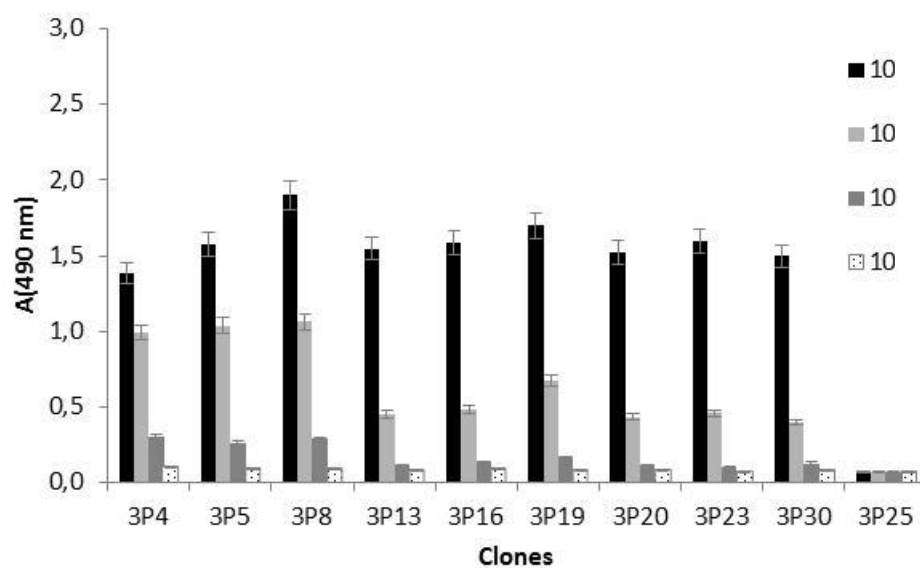
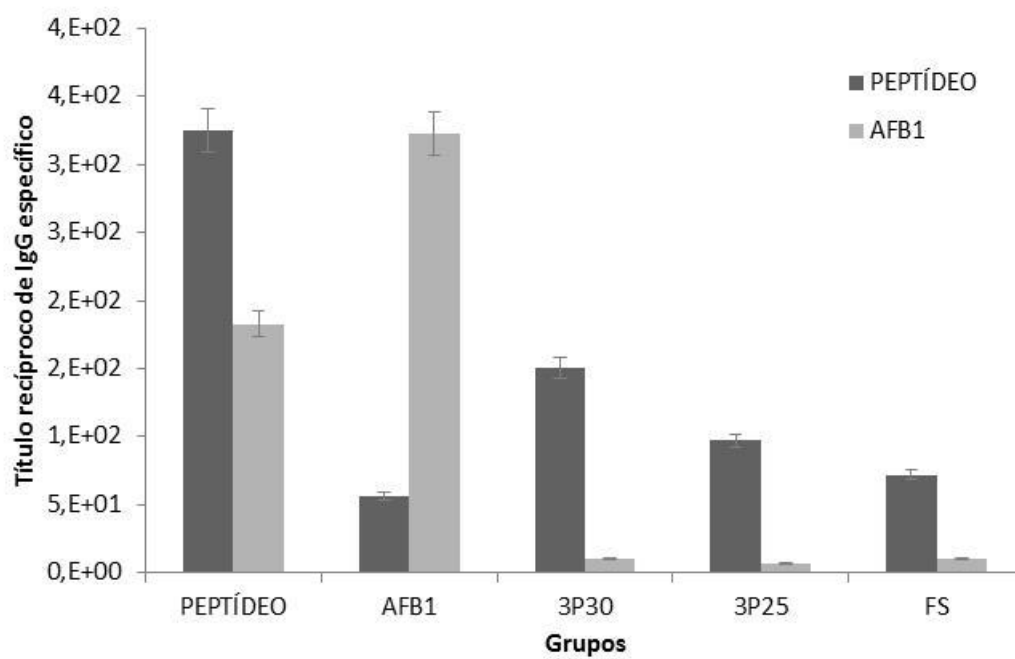


Figura 7



RESUMO

SEQUÊNCIA PEPTÍDICA MIMÉTICA DE AFLATOXINA APLICADA COMO IMUNÓGENO

A presente invenção está relacionada com o campo técnico da biotecnologia, sendo caracterizada por compreender a sequência aminoacídica QTDLDY LHPLINSWN capaz de induzir a produção de anticorpos específicos que reconhecem a aflatoxina B1. Com o objetivo de substituir conjugados de aflatoxina em imunizações e propor um modelo de imunização contra a toxina, foi obtido o imunógeno baseado no mimotopo, i.e. peptídeo mimético de aflatoxina expresso na superfície de bacteriófagos. O bacteriófago recombinante 3P30 foi selecionado pela técnica de *phage display* (Fig. 1, 2 e 3) e exibiu habilidade de ligação específica ao seu alvo cognato, anticorpo anti-AFB1 (Fig. 4), quando comparado a ligantes irrelevantes (Fig. 5), demonstrando perfil dose dependente (Fig. 6). Em ensaio de imunização, o mimotopo expresso em fago e o peptídeo sintetizado quimicamente foram capazes de induzir anticorpos anti-peptídeo que reconhecem a aflatoxina (Fig. 7). Esta estratégia comprova o mimetismo entre o peptídeo e a toxina, permitindo a aplicação do peptídeo mimético de aflatoxina para o desenvolvimento de vacinas.