



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

(21) BR 102018071672-7 A2



(22) Data do Depósito: 22/10/2018

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

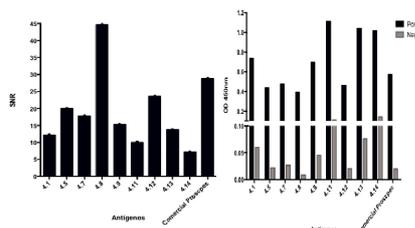
(54) Título: POLIPEPTÍDEO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, KIT PARA TRIAGEM IMUNOLÓGICA DE HCV E/OU DIAGNÓSTICO DE HEPATITE C, COMPOSIÇÃO, USO DE PELO MENOS UM POLIPEPTÍDEO, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, PARA TRIAGEM IMUNOLÓGICA DE HCV E PARA O DIAGNÓSTICO DE HEPATITE C

(51) Int. Cl.: C07K 14/18; C12N 1/21; C12N 15/51; C12N 15/62; C12N 15/63; (...).

(71) Depositante(es): FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ; INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ - IBMP; INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ (TECPAR).

(72) Inventor(es): NILSON IVO TONIN ZANCHIN; MARCO AURÉLIO KRIEGER; LUCIANNA FREITAS OLIVEIRA DE LIMA.

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, KIT PARA TRIAGEM IMUNOLÓGICA DE HCV E/OU DIAGNÓSTICO DE HEPATITE C, COMPOSIÇÃO, USO DE PELO MENOS UM POLIPEPTÍDEO, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, PARA TRIAGEM IMUNOLÓGICA DE HCV E PARA O DIAGNÓSTICO DE HEPATITE C. A presente invenção refere-se a polipeptídeos com atividade imunogênica, que podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto, com alta capacidade de discriminação para a triagem do vírus da hepatite C. A invenção também se refere ao ácido nucleico, cassete de expressão, vetor de expressão, célula hospedeira, método de produção dos polipeptídeos, composição, uso dos polipeptídeos, kit para triagem imunológica de HCV e/ou diagnóstico de hepatite C, bem como aos métodos para triagem imunológica de HCV e diagnóstico de hepatite C.



“POLIPEPTÍDEO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, KIT PARA TRIAGEM IMUNOLÓGICA DE HCV E/OU DIAGNÓSTICO DE HEPATITE C, COMPOSIÇÃO, USO DE PELO MENOS UM POLIPEPTÍDEO, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, PARA TRIAGEM IMUNOLÓGICA DE HCV E PARA O DIAGNÓSTICO DE HEPATITE C”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se ao campo da medicina diagnóstica e da biotecnologia. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a polipeptídeos para aplicação diagnóstica na triagem para o vírus da hepatite C.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A Hepatite C é uma doença viral silenciosa grave que pode resultar em problemas de saúde a longo prazo. A Organização Mundial da Saúde estima que aproximadamente 170 milhões de pessoas são cronicamente infectadas pelo vírus da hepatite C. Dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos revelaram que a mortalidade anual relacionada à hepatite C em 2013 superou o total de mortes combinadas de outras 60 doenças infecciosas, incluindo infecção pelo HIV, por pneumococos e tuberculose, matando mais que qualquer outra doença infecciosa (HEPATITIS C MORTALITY, 2016).

[003] Devido à característica silenciosa, 70 a 80% dos infectados desconhecem seu estado sorológico e apenas 20 a 30% podem vir a apresentar sintomas (CHEN e MORGAN, 2006). Por isso, a Organização Mundial da Saúde recomenda que todas as doações de sangue sejam testadas para as hepatites B e C, além de outras doenças infecciosas. O objetivo é garantir a segurança do sangue a ser transfundido e evitar a transmissão viral acidental em pessoas que venham a receber hemoderivados.

[004] O agente etiológico da hepatite C é um vírus esférico de 55-65 nm de diâmetro, envelopado, cujo genoma é uma molécula de 9,3 kilobase com

organização genética de flavivírus (MELLO, 2014). A replicação do vírus ocorre via RNA, polaridade positiva, cadeia simples (ssRNA), linear, que contém regiões não traduzidas (UTRs) e que flanqueiam uma sequência de leitura aberta ininterrupta que codifica uma única poliproteína de 3.011 aminoácidos: NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5BCOOH (LIN et al., 1994). Esta poliproteína precursora é posteriormente clivada por proteases celulares e virais liberando proteínas estruturais (C-E1-E2-p7) e não estruturais (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B), que incluem elementos de controles necessários para a tradução e replicação viral.

[005] Sabe-se que proteínas não estruturais participam da replicação viral, enquanto as estruturais fazem parte da estrutura do capsídeo e formam as glicoproteínas do envelope. As proteínas estruturais são liberadas da poliproteína após clivagem por proteases celulares, enquanto as não-estruturais são clivadas por proteases virais (de VICENTE et al., 2009; CHATEL-CHAIX, et al., 2011). Cada uma delas assume diferentes funções no ciclo do vírus.

[006] A proteína do nucleocapsídeo regula processos celulares, contribuindo para a replicação e patogênese, além de estar envolvida na montagem e empacotamento do genoma viral (LIN et al., 1993; LIN et al., 1994). Esta proteína possui 191 aminoácidos e está localizada na região N-terminal da poliproteína viral (McLAUCHLAN et al., 2002).

[007] As proteínas do envelope E1 e E2 formam heterodímeros que representam a forma nativa do envelope de HCV. São altamente glicosiladas e vulneráveis a mutações genéticas (ZENG et al., 2012), conseqüentemente, podem alterar importantes propriedades antigênicas do vírus promovendo o escape de anticorpos neutralizantes. Também desempenham importante papel na entrada do vírus na célula (ZENG et al., 2012) e, embora o papel da região E1 e sua associação com os ligantes da superfície da célula ainda não é clara, o papel da proteína E2 está melhor definido, atuando diretamente na ligação a receptores de superfície da célula, dentre eles o CD81 (PIVER et al., 2010; FREEDMAN

et al., 2016). O CD81 é expresso na maioria das células humanas, incluindo hepatócitos e a união dessa molécula com a proteína E2 do vírus induz alterações funcionais e pode estimular a proliferação de linfócitos B não ativados ou à produção de citocinas inflamatórias (ROSA et al., 2005).

A região que codifica para a proteína p7 (HCV-NS1) é uma glicoproteína de envelope que pode ser encontrada nas membranas celulares de indivíduos infectados. A proteína é clivada no retículo endoplasmático em reação mediada por peptídeo sinal. Esta é uma região essencial para a liberação de viriões, funcionando como canais iônicos (HUANG et al., 2010).

[008] A região não estrutural NS2 é uma proteína de 21-23 kDa que interage com outras proteínas não estruturais para participar da montagem da partícula viral. Trata-se de uma cisteína com atividade de protease responsável pela clivagem da região NS2/NS3 (POPESCU et al., 2011; KIM et al., 2012).

[009] A proteína NS3 possui atividade catalítica de serina-protease e helicase que juntamente com o cofator NS4A, participa da clivagem das regiões NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A e NS5A/5B durante o processamento (De VICENTE et al., 2009; FREEDMAN et al., 2016).

[0010] A NS4A é necessária para a fosforilação da polimerase NS5A. Há pouca informação sobre a função da proteína NS4B. Sugere-se que ela participa da formação de uma membrana onde ocorre a replicação do RNA do HCV (KIM et al., 1996; MASSARIOL et al., 2010).

[0011] A NS5A tem importante papel na replicação viral, na modulação da sinalização celular e na resposta ao interferon (YAMANAKA et al., 2002). A região B da proteína (NS5B) atua como uma RNA polimerase RNA dependente e desempenha uma importante função na síntese do novo RNA (PRATT et al., 2005; OLIVEIRA, 2007; KEYVANI et al., 2012).

[0012] A replicação viral rápida e a falta de revisões de erros pela RNA-polimerase viral são as principais razões pelas quais o genoma do HCV sofre frequentes mutações. Isto explica o fato de o vírus da hepatite C possuir

oficialmente seis genótipos, identificados por números arábicos (de 1 a 6) que são subdivididos em mais de 50 subtipos (1a, 1b, 2a, etc.). A diferença na sequência de nucleotídeos entre os genótipos 1 ao 6 pode alcançar 30 a 35%, ao passo que os subtipos diferem em cerca de 20% (SIMMONDS et al., 1993 (b)).

[0013] Os subtipos 1, 2 e 3 têm distribuição mundial, sendo o subtipo 1 o mais comum. Esse é o genótipo mais resistente ao tratamento e representa 60% da infecção global e predomina na América do Norte e Sul, na Europa do Norte e Europa Oriental (GUPTA et al., 2014). O genótipo 2 representa 9,1% dos casos de hepatite C em todo o mundo e é descrito como um dos genótipos com melhor resposta para o tratamento (HANAFIAH et al., 2013). O genótipo 3 é o segundo mais prevalente no mundo, sendo endêmico no sudeste da Ásia e acometendo 30% da população. O genótipo 4 tem maior prevalência no Oriente Médio, onde é responsável por 90% dos casos de hepatite C no Egito, no norte da África e na África central. O genótipo 5 possui maior distribuição na África do Sul e pouco se sabe sobre ele, que representa 0,8% da população mundial. O genótipo 6 corresponde a 5,4% das hepatites no sudeste da Ásia e uma distribuição mundial inferior ao genótipo 5 (SHEPARD et al., 2005; HANAFIAH et al., 2013; GUPTA et al., 2014; MESSINA et al., 2015).

[0014] A extensa heterogeneidade genética do HCV tem implicações importantes na resposta imune, na clínica e no diagnóstico da doença, o que torna um desafio o desenvolvimento de vacinas e a resposta às terapias.

[0015] Atualmente, o critério mínimo estabelecido pela Organização Mundial da Saúde para se certificar do diagnóstico do HCV é que ele apresente uma sensibilidade >99% para os testes rápidos e de 100% para ensaios ELISA e que a especificidade seja de >98%.

[0016] São dois os principais marcadores da infecção para o vírus da hepatite C: o marcador sorológico anti-HCV e a presença do RNA do vírus no soro do indivíduo. Os ensaios sorológicos possuem alta sensibilidade, mas não distinguem infecção ativa ou resolvida, podendo ser desenvolvidos para cepas

específicas a partir de uma região que conferem sensibilidades menores quando utilizados em países cujos genótipos circulantes sejam diferentes (BRAND, 2014). Por este motivo, recomenda-se a confirmação da infecção pelo vírus por testes suplementares ou confirmatórios de detecção do genoma viral (CLOHERTY et al., 2015) fazendo uso da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), de forma a permitir a identificação dos subtipos virais. Contudo, devido ao alto custo, esta técnica não é plenamente acessível em áreas geograficamente remotas e de baixa economia.

[0017] Os primeiros imunoenaios no formato EIA/ELISA foram desenvolvidos para a detecção utilizando um único alvo ou pela exposição de apenas um epítopo. Estes ensaios apresentaram altos índices de reatividade cruzada, baixa sensibilidade e a necessidade de repetições. No caso específico da identificação do vírus da hepatite C, o diagnóstico tinha por base a região não estrutural da proteína NS4 que, mesmo apresentando sensibilidade de 40%, permitiu o início da prevenção por transmissão transfusional.

[0018] Devido às medidas preventivas e com o advento de ensaios mais sensíveis foram introduzidos aos testes para diagnóstico outras regiões antigênicas do vírus, o que permitiu a classificação dos testes ensaios de segunda, terceira e quarta geração (KAMILI et al., 2012; GUPTA et al., 2014), que levaram do aumento da sensibilidade e à diminuição no número de casos de transmissão por via transfusional.

[0019] Os testes em microesferas apresentam sensibilidade superior aos testes comerciais ELISA e é capaz de analisar misturas complexas. A empresa *Luminex Corporation* desenvolveu um sistema de microarranjo líquido para analisar ensaios fluorescentes tendo as esferas como suportes sólidos, sistema esse nomeado LUMINEX. Esse sistema faz uso da tecnologia da microfluídica e da ligação de moléculas alvo às microesferas onde acontece a reação.

[0020] Os ensaios para detecção de HCV disponíveis na técnica, apesar de empregarem antígenos multiepítopos, ainda apresentam muitas desvantagens,

como, por exemplo, o fato de serem desenvolvidos para um perfil genético de cepas circulantes em regiões específicas que podem diferir dos genótipos que circulam em regiões geográficas onde são comercializados ou não serem aplicados em ensaios *multiplex* (FONSECA et al., 2011; ARAÚJO et al., 2011; GALDINO et al., 2015 e DIPTI et al., 2006).

[0021] Adicionalmente, os ensaios ELISA para triagem da hepatite C apresentam alta variabilidade quanto a sensibilidade quando aplicados em países ricos e pobres, cujos desempenhos são consideravelmente menores em países pobres (KHUROO et al., 2015). Além disso, os imunoenaios apresentam altos índices de falso-negativos quando utilizados para diagnosticar pacientes imunodeficientes ou hemodialisados. Soma-se a isto, o fato de que os testes sorológicos disponíveis não são capazes de diferenciar a infecção aguda da infecção crônica (SHIVKUMAR et al., 2012). Por fim, a variabilidade genética para o vírus da hepatite C chega a apresentar 30-35% (SIMMONDS et al., 1993) e para alguns epítomos até 49%, o que pode gerar respostas genótipo-específicas e diminuir a sensibilidade de um ensaio.

[0022] Outros desafios relacionados aos ensaios sorológicos para HCV, além do tempo de execução, é a presença de uma zona cinza a partir da qual alguns resultados não são interpretáveis (SALUDES et al., 2014). No último caso, recomenda-se a repetição do ensaio sorológico em duplicata para confirmar a condição do paciente. Se as repetições estiverem abaixo do limite do ensaio, a amostra deve ser considerada negativa. Se o resultado for superior ou igual ao ponto de corte, a amostra deve ser testada por testes confirmatórios.

[0023] Apesar da recomendação, os testes confirmatórios para o diagnóstico da hepatite C não são amplamente utilizados em países pobres, por razões financeiras ou relacionadas à sua complexidade ou, ainda, pela falta de laboratórios equipados e pessoal treinado (KAMILI et al., 2012; VITAL SIGNS, 2016).

[0024] As vantagens da invenção serão evidentes na descrição da

invenção fornecida neste documento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0025] A presente invenção tem por objetivo prover polipeptídeos a partir de diferentes regiões do vírus da hepatite C que solucionem os principais problemas do estado da técnica listados anteriormente.

[0026] Os referidos polipeptídeos apresentam alto grau de pureza e alta capacidade de discriminação sorológica para aplicação diagnóstica na triagem para o vírus da hepatite C, com a finalidade de cobrir 100% dos pacientes positivos, considerando a variabilidade representada pelos diferentes genótipos do vírus.

[0027] Particularmente, foram desenvolvidos polipeptídeos que podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto em ensaios imunodiagnósticos com capacidade de discriminação muito alta para a triagem do vírus da hepatite C.

[0028] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê um polipeptídeo compreendendo pelo menos duas regiões antigênicas do vírus da hepatite C (HCV) selecionadas a partir do grupo selecionado de região do nucleocapsídeo (NC) e regiões não estruturais NS3, NS4 e NS5.

[0029] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo.

[0030] Em um terceiro aspecto, a presente invenção provê um cassete de expressão compreendendo o referido polinucleotídeo.

[0031] Em um quarto aspecto, a presente invenção provê um vetor de expressão que compreende o ácido nucleico o cassete de expressão descritos acima.

[0032] Em um quinto aspecto, a presente invenção provê uma célula hospedeira que compreende o ácido nucleico, vetor de expressão ou cassete de expressão como definidos acima.

[0033] Em um sexto aspecto, a presente invenção provê um método para produzir um polipeptídeo que compreende:

(a) transformar uma célula hospedeira com o polinucleotídeo como definido acima,

(b) cultivar dita célula para a produção do polipeptídeo; e

(c) isolar dito polipeptídeo de dita célula ou do meio de cultura circundando dita célula.

[0034] Em um sétimo aspecto, a presente invenção provê uma composição que compreende um polipeptídeo como definido acima ou uma combinação de dois ou mais polipeptídeos definidos acima.

[0035] Em um oitavo aspecto, a presente invenção provê um kit para triagem imunológica de HCV e/ou diagnóstico de hepatite C que compreende pelo menos um polipeptídeo da presente invenção.

[0036] Em um nono aspecto, a invenção provê o uso de pelo menos um polipeptídeo, da composição ou do kit descritos acima na triagem imunológica de HCV e/ou diagnóstico de hepatite C.

[0037] Em um décimo aspecto, a invenção provê um método para triagem imunológica do HCV, que compreende as etapas de:

(a) prover um ou mais polipeptídeos ou uma composição como definidos acima;

(b) contatar um ou mais peptídeos ou composição descritos acima com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/ antígeno; e

(c) detectar o complexo antígeno/anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/anticorpo.

[0038] Em um décimo primeiro aspecto, a invenção provê um método para diagnóstico de hepatite C, que compreende as etapas de:

(b) prover um ou mais polipeptídeos ou uma composição como definidos acima;

(b) contatar um ou mais peptídeos ou composição descritos

acima com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/ antígeno; e

(c) detectar o complexo antígeno/anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/anticorpo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0039] A Figura 1 mostra a análise quantitativa das frações obtidas após a purificação dos polipeptídeos em cromatógrafo ÄKTA; A) Gel SDS-PAGE 13 %; B) *Western Blotting*; M: Marcador de massa molecular. Os quadros delimitam os polipeptídeos de interesse para a presente invenção.

[0040] A Figura 2 mostra um gel de SDS-PAGE (13%) revelando em A) o estado dos polipeptídeos logo a purificação e em B) o estado dos polipeptídeos após a sequência de descongelamentos em banho de gelo, após um ano. Os quadros delimitam os polipeptídeos de interesse para a presente invenção.

[0041] A Figura 3 mostra o desenho do painel completo AEQ composto por 188 soros, dos quais 23 são reativos para HCV, 26 para HIV 1/2, 30 HTLV 1/2, 31 HBV, 30 Sífilis, 28 Chagas e 21 soros são negativos para todos os patógenos que compõe o painel.

[0042] A Figura 4 mostra os parâmetros gerados através das análises de desempenho individual dos antígenos por ensaio ELISA.

[0043] A Figura 5 mostra os parâmetros gerados através das análises de desempenho dos antígenos por ensaios ELISA em combinação.

[0044] A Figura 6 mostra os parâmetros obtidos a partir do desempenho do Antígeno 1, identificando a melhor condição de acoplamento.

[0045] A Figura 7 mostra os parâmetros obtidos a partir do desempenho do Antígeno 2, identificando a melhor condição de acoplamento.

[0046] A Figura 8 mostra os parâmetros obtidos a partir do desempenho do Antígeno 3, identificando a melhor condição de acoplamento.

[0047] A Figura 9 mostra os parâmetros obtidos a partir do desempenho do Antígeno 4, identificando a melhor condição de acoplamento.

[0048] A Figura 10 mostra os parâmetros obtidos a partir do desempenho do Antígeno 5, identificando a melhor condição de acoplamento.

[0049] A Figura 11 mostra a análise dos ensaios em combinação realizados no formato *multiplex* via sistema LUMINEX.

[0050] A Figura 12 mostra parâmetros gráficos para avaliação da capacidade individual de separação dos antígenos por ensaios no formato ELISA, em que A mostra SNR (*Signal to Noise Ratio*) do ensaio ELISA e B mostra a média dos sinais por ensaio ELISA, na qual os sinais “Pos” = a média dos soros positivos e “Neg” = a média dos soros negativos.

[0051] A Figura 13 mostra os parâmetros gráficos para avaliação da capacidade individual de separação dos antígenos por ensaios no formato LUMINEX *singleplex*, em que A mostra o SNR (*Signal to Noise Ratio*) do ensaio LUMINEX e B mostra média dos sinais obtidos, na qual os “Sinais Pos” = a média dos soros positivos e “Sinais Neg” = a média dos soros negativos.

[0052] A Figura 14 mostra parâmetros gráficos para avaliação da capacidade de separação de combinações dos antígenos por ensaios no formato ELISA combinado, em que A mostra SNR do ensaio ELISA e B mostra média dos sinais das combinações de antígenos, na qual os sinais “Sinais +” = a média dos soros positivos e “Sinais -” = a média dos soros negativos.

[0053] A Figura 15 mostra parâmetros gráficos para avaliação da capacidade de separação de combinações dos antígenos por ensaios no formato LUMINEX *multiplex*, em que A mostra SNR (*Signal to Noise Ratio*) das combinações no ensaio LUMINEX e B mostra média dos sinais obtidos para as combinações no LUMINEX, na qual os sinais “Positivos” = a média dos soros positivos e “Negativos” = a média dos soros negativos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0054] 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.

[0055] 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.).

[0056] Os presentes inventores solucionaram o problema do estado da técnica provendo polipeptídeos construídos a partir de diferentes regiões do vírus da hepatite C, de diferentes genótipos, com alto grau de pureza e alta capacidade de discriminação sorológica. As análises revelaram que os antígenos da invenção, usados em ensaios de triagem imunológica, apresentaram maior desempenho e melhor capacidade de separação entre os soros positivos e negativos, além de não ter sido detectada qualquer reação cruzada quando

expostos a amostras positivas para outras doenças infecciosas.

[0057] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê um polipeptídeo compreendendo pelo menos duas regiões antigênicas do HCV selecionadas a partir do grupo selecionado de região do nucleocapsídeo (NC) e regiões não estruturais NS3, NS4 e NS5.

[0058] As referidas regiões antigênicas do HCV são conhecidas e apresentam variabilidade no desempenho, o que é amplamente discutido na arte relacionada ao diagnóstico da hepatite C. Com base no estado da técnica, principalmente no que se refere à variabilidade do HCV, foram definidas sequências de regiões antigênicas do vírus para os compor desenhos dos polipeptídeos da presente invenção.

[0059] Atentando-se para a baixa identidade entre epítomos e considerando a variabilidade entre os genótipos existentes, os inventores desenvolveram polipeptídeos específicos com a possibilidade de utilizá-los individualmente ou em conjunto, a fim de obter maior representatividade, tendo em vista que a variabilidade apresentada pode levar ao não reconhecimento de anticorpos genótipo-específico.

[0060] Dessa forma, os inventores desenvolveram polipeptídeos multiepítomo obtidos pela junção de regiões estruturais e não estruturais do HCV.

[0061] Inicialmente, foram desenvolvidos 14 clones (nomeadas por códigos numéricos de 4.1 a 4.14, conforme identificado nas figuras), os quais continham diferentes combinações entre a região imunogênica da proteína estrutural do nucleocapsídeo e as regiões não estruturais NS3, NS4 e NS5 para os genótipos 1 ao 6. A Tabela 1 abaixo identifica as construções correspondentes para cada um dos 14 clones.

Tabela 1: identificação dos 14 clones construídos, com as regiões incluídas em cada um e seus respectivos genótipos.

CLONE	CONSTRUÇÃO	GENÓTIPO
-------	------------	----------

4.1	NS3	1b
4.2	NC	1b
4.3	NS4	1b
4.4	NS4	1b
4.5	NC / NS4 / NS5	1b
4.6	NC / NS4 / NS5	2a
4.7	NC / NS4 / NS5	3a
4.8	NC / NS4 / NS5	4
4.9	NC / NS4 / NS5	5
4.10	NC / NS4 / NS5	6
4.11	NC / NS4	1b
4.12	NS3 / NS5	1b
4.13	NS3 / NS4	1b
4.14	NC / NS5	1b

[0062] Após testes de expressão e purificação, os clones 4.2, 4.3, 4.4, 4.6 e 4.10 foram descartados, tendo em vista os resultados negativos obtidos com os mesmos (resultados não mostrados).

[0063] Os nove clones expressos e purificados com sucesso (clones 4.1, 4.5, 4.7, 4.8, 4.9, 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14) foram testados em imunoenaios, evidenciando que todos os antígenos purificados possuem eficiência compatível com as características desejadas para a aplicação diagnóstica na triagem da hepatite C.

[0064] Dentre os clones desenvolvidos pelos inventores, o uso combinado de cinco deles apresentou melhor resultado em ensaios de combinação, quais sejam, os clones 4.7, 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14. Esses clones apresentam os genótipos 1b e 3a, os quais são os mais prevalentes no Brasil, e foram construídos tendo como sequências de referência as sequências da poliproteína de HCV ID #ACH53426.1 e #ACZ60118.1, respectivamente.

[0065] No contexto da presente invenção, os polipeptídeos 4.7, 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14 serão também referidos como antígenos 1 a 5, respectivamente:

Antígeno 1: SEQ ID NO: 1

Sequência de Referência (SR): ID #ACZ60118.1

Região NC-3a: aminoácidos 1-119 da SR

Região NS4-3a: aminoácidos 1691-1731/1789-1867/1922-1940 da SR

Região NS5-3a: aminoácidos 2216-2319 da SR

Antígeno 2: SEQ ID NO: 3

Sequência de Referência (SR): ID #ACH53426.1

Região NC-1b: aminoácidos 2-119 da SR

Região NS4-1b: aminoácidos 1691-1731/1789-1867/1922-1940 da SR

Antígeno 3: SEQ ID NO: 5

Sequência de Referência (SR): ID #ACH53426.1

Região NS3-1b: aminoácidos 1192-1459 da SR

Região NS5-1b: aminoácidos 2212-2313 da SR

Antígeno 4: SEQ ID NO: 7

Sequência de Referência (SR): ID #ACH53426.1

Região NS3-1b: aminoácidos 1192-1459 da SR

Região NS4-1b: aminoácidos 1691-1731/1789-1867/1922-1940 da SR

Antígeno 5: SEQ ID NO: 9

Sequência de Referência (SR): ID #ACH53426.1

Região NC-1b: aminoácidos 1-190 da SR

Região NS5-1b: aminoácidos 2212-2313 da SR

[0066] Em um aspecto preferencial, os polipeptídeos são pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo

menos 99% idênticos às sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9, em que um ou mais aminoácidos são opcionalmente substituídos, adicionados ou deletados em relação à sequência das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9.

[0067] Em um aspecto ainda mais preferencial, os polipeptídeos consistem nas sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9.

[0068] 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.

[0069] 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 ou terno de bases. 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.

[0070] 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.

[0071] Mais especificamente, o termo polipeptídeo da presente invenção pode também ser entendido como antígeno, poliantígeno ou antígeno multiepítopo, que consistem em uma junção de epítomos diferentes que podem ou não estar interligados por ligantes (*linkers*) flexíveis ou rígidos, específicos para um único patógeno ou para patógenos diferentes.

[0072] O termo “identidade” é definido como o grau de igualdade entre sequências de DNA ou de aminoácidos quando comparados nucleotídeo por nucleotídeo ou aminoácido por aminoácido com uma sequência de referência.

[0073] O termo “porcentagem de identidade de sequências” refere-se a comparações entre polinucleotídeos ou polipeptídeos e é determinado por duas sequências idealmente alinhadas, sob determinados parâmetros de comparação. Este alinhamento pode compreender espaços (*gaps*), gerando intervalos quando comparadas à sequência de referência, que facilitam uma comparação adequada das mesmas. De maneira geral, o cálculo da porcentagem de identidade considera o número de posições onde o mesmo nucleotídeo ou aminoácido ocorre nas sequências comparadas à sequência referência, sendo realizado através de diversos algoritmos de comparação de sequências e programas conhecidos no estado da arte. Tais algoritmos e programas incluem, mas não são limitados a, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, CLUSTALW,

FASTDB.

[0074] O polipeptídeo compreendendo os fragmentos antigênicos da presente invenção podem ser obtidos de forma recombinante ou sintética. Em uma modalidade particular, os polipeptídeos da presente invenção são obtidos por meio de um sistema de expressão, o qual permite a obtenção dos polipeptídeos da presente invenção.

[0075] Por sistema de expressão, entende-se um sistema compreendendo as sequências nucleotídicas, as quais são capazes de codificar polipeptídeos.

[0076] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê polinucleotídeos compreendendo sequências nucleotídicas que codificam os polipeptídeos aqui descritos.

[0077] Os polinucleotídeos de acordo com a invenção são representados, de forma não limitativa, pelas SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 e 10 e suas degenerações, ou sequências com pelo menos 90% de identidade com as SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 e 10. Os polinucleotídeos das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 e 10 codificam os polipeptídeos representados pelas SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 e 9, respectivamente.

[0078] As sequências polinucleotídicas foram construídas para inserção de um *poly-linker* no início das sequências (traduzido como *Met Ala Gly Ser* nas SEQ ID Nos. 1, 3, 5, 7 e 9), sítios de clonagem (enzimas NCO I, BAM HI, ECO RI, códon de terminação e Hind III). A tradução dos aminoácidos correspondentes aos códons localizados à jusante do(s) códon(s) de terminação não estão mostrados nas SEQ ID NOs. 1, 3, 5, 7 e 9.

[0079] O termo “sequência de nucleotídeos degenerada” denota uma sequência de nucleotídeos que inclui um ou mais códons degenerados quando comparada com uma molécula de ácido nucleico de referência que codifica um dado polipeptídeo. Códons degenerados contêm diferentes tripletes de nucleotídeos, mas codificam o mesmo resíduo de aminoácido (p.ex., GAU e

GAC ambos codificam Asp).

[0080] Um técnico no assunto reconheceria que as degenerações são integralmente suportadas com base nas informações fornecidas no pedido e no conhecimento comum do estado da técnica. Por exemplo, a degeneração do código genético (isto é, diferentes códons podendo codificar os mesmos aminoácidos) é um conhecimento comum na técnica e a identidade do aminoácido codificado por cada códon é bem estabelecida.

[0081] Com base nas informações bem conhecidas e estabelecidas no estado da técnica, o técnico no assunto é capaz de identificar as substituições de nucleotídeos que não alteram a sequência de aminoácidos resultante. Assim, quando em posse tanto da sequência de nucleotídeos de um gene quanto da sequência de aminoácidos da proteína codificada, o técnico no assunto identificará facilmente as degenerações que codificam a mesma proteína, com a mesma sequência de aminoácidos.

[0082] O uso dos códons preferidos pode ser adaptado de acordo com a célula hospedeira na qual o ácido nucleico deve ser transcrito. Estas etapas podem ser realizadas de acordo com métodos bem conhecidos do versado na técnica e dos quais alguns são descritos no manual de referência Sambrook *et al.* (Sambrook et al, 2001).

[0083] Neste sentido, diferentes espécies podem exibir um “códon usage” preferencial. Vide Grantham et al., *Nuc. Acids Res.* 8:1893 (1980), Haas et al. *Curr. Biol.* 6:315 (1996), Wain-Hobson *et al.*, *Gene* 13:355 (1981), Grosjean and Fiers, *Gene* 18:199 (1982), Holm, *Nuc. Acids Res.* 14:3075 (1986), Ikemura, *J. Mol. Biol.* 158:573 (1982), Sharp and Matassi, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:851 (1994), Kane, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:494 (1995), and Makrides, *Microbiol. Rev.* 60:512 (1996). Como usado aqui, o termo “códon usage preferencial”, ou “códon preferenciais” é um termo usado na arte referindo-se a códons que são mais frequentemente utilizados em células de certas espécies. Códon preferenciais para uma espécie em particular podem

ser introduzidos nos polinucleotídeos da presente invenção por uma variedade de métodos conhecidos na arte. A introdução de sequências de códons preferenciais em um DNA recombinante pode, por exemplo, aumentar a produção do polipeptídeo ao tornar a tradução mais eficiente em um determinado tipo de célula. Assim, as sequências de polinucleotídeo da invenção podem ser otimizadas para diferentes espécies.

[0084] Em um aspecto preferencial, os ácidos nucleicos da presente invenção tiveram os códons otimizados.

[0085] Em um aspecto ainda mais preferencial, os ácidos nucleicos da presente invenção tiveram os códons otimizados para substituição dos códons raros, distribuição de conteúdo GC e remoção de sequências repetitivas visando a transcrição e estabilidade e tradução do mRNA, para obtenção de altos níveis de expressão em sistema procarioto.

[0086] Em um aspecto particular, os ácidos nucleicos da invenção são otimizados para uso de códon para *Escherichia coli*. Em uma modalidade preferida, as sequências de nucleotídeos são otimizadas para substituição de códons raros.

[0087] Em um terceiro aspecto, a presente invenção provê um cassete de expressão compreendendo o ácido nucleico de acordo com a invenção. O referido cassete é colocado em condições que conduzam à expressão dos polipeptídeos da presente invenção.

[0088] O cassete de expressão pode compreender, ainda, sequências necessárias à sua expressão, tais como, promotores, sequências intensificadoras e terminadoras compatíveis com o sistema de expressão. Ademais, o cassete de expressão pode compreender sequências espaçadoras, sequências ligadoras e sítios de restrição adequados. Além disso, o cassete pode compreender, ainda, uma sequência codificante para cauda de histidina.

[0089] Em um quarto aspecto, a presente invenção provê um vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico ou um cassete de expressão de

acordo com a invenção. Este vetor de expressão pode ser utilizado para transformar uma célula hospedeira e permitir a expressão do ácido nucleico de acordo com a invenção na referida célula.

[0090] Com vantagem, o vetor de expressão compreende elementos reguladores que permitem a expressão do ácido nucleico e elementos que permitem a sua seleção na célula hospedeira de acordo com a invenção. Os métodos para selecionar estes elementos em função da célula hospedeira na qual a expressão é desejada, são bem conhecidos do versado na técnica e amplamente descritos na literatura.

[0091] Os vetores podem ser construídos por técnicas clássicas de biologia molecular, bem conhecidas do versado na técnica. Exemplos não limitantes de vetores de expressão adequados para expressão em células hospedeiras são plasmídeos e vetores virais ou bacterianos.

[0092] Em um quinto aspecto, a presente invenção provê uma célula hospedeira transformada/transfectada de maneira transitória ou estável com o ácido nucleico, o cassete ou o vetor da invenção. O ácido nucleico, o cassete ou o vetor pode estar contido na célula sob a forma de epissoma ou sob forma cromossômica.

[0093] A célula hospedeira pode ser uma célula de bactéria, levedura, fungos filamentosos, protozoários, insetos, células animais e vegetais.

[0094] Em um aspecto específico, a célula hospedeira é uma célula bacteriana, preferivelmente uma célula de *Escherichia coli*.

[0095] Em um sexto aspecto, a presente invenção provê método para produzir o polipeptídeo de acordo com a invenção, compreendendo a inserção de um ácido nucleico, um cassete ou um vetor de expressão de acordo com a invenção em um sistema de expressão *in vivo* e a coleta do polipeptídeo produzido pelo referido sistema. Numerosos sistemas de expressão *in vivo*, compreendendo o uso de células hospedeiras adequadas, estão disponíveis no comércio e a utilização destes sistemas é bem conhecida do versado na técnica.

[0096] Sistemas de expressão particularmente adequados incluem microrganismos, como bactérias transformadas com vetores de expressão de DNA recombinante de bacteriófago, plasmídeo ou cosmídeo; levedura transformada com vetores de expressão de levedura; sistemas de células de insetos infectadas com vetores de expressão de vírus (por exemplo, baculovírus); sistemas de células de plantas transformados com vetores de expressão de vírus (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV [*cauliflower mosaic virus*]; vírus do mosaico do tabaco, TMV [*tobacco mosaic virus*]) ou com vetores de expressão bacterianos (por exemplo, plasmídeos Ti ou pBR322); ou sistemas de células animais. Também é possível empregar sistemas de tradução isentos de células para produzir os polipeptídeos da invenção.

[0097] A introdução do ácido nucleico, cassete de expressão ou o vetor que codifica uma proteína recombinante ou sintética da presente invenção em células hospedeiras pode ser realizada por meio de métodos descritos em muitos manuais de laboratório padrão, como Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology (1986) e Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989).

[0098] A célula hospedeira transformada ou transfectada descrita acima é depois cultivada em um meio nutriente adequado sob condições conducentes que permitam a expressão das proteínas recombinantes da invenção. O meio usado para cultivar as células pode ser qualquer meio convencional adequado para desenvolver as células hospedeiras, tal como meio mínimo ou complexo contendo suplementos apropriados. Os meios adequados estão disponíveis a partir de fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com receitas publicadas (por exemplo, nos catálogos da American Type Culture Collection). As proteínas da invenção produzidos pelas células podem ser depois recuperados da célula ou do meio de cultura por procedimentos convencionais incluindo separar as células hospedeiras do meio

pela centrifugação ou filtração, precipitando os componentes aquosos de proteína do sobrenadante ou filtrado por meio de um sal, por exemplo, sulfato de amônio, purificação por uma variedade de procedimentos cromatográficos, por exemplo cromatografia por troca iônica, cromatografia por exclusão, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia por filtração em gel, cromatografia por afinidade ou similares, dependente do tipo de polipeptídeo em questão.

[0099] O polipeptídeo recombinante obtido é, então, purificado e caracterizado bioquimicamente, utilizando-se, por exemplo, métodos comuns ao campo da bioquímica, como HPLC, SDS-PAGE, *Western Blotting*, focalização isoeétrica com gradiente de pH, dicroísmo circular. Por meio desses métodos, é possível determinar características como, por exemplo, o rendimento da expressão do polipeptídeo recombinante; a determinação das características das estruturas secundárias, além de outras características cuja determinação é importante para o desenvolvimento de uma composição para uso como reagente para diagnóstico da Hepatite C.

[00100] Os polipeptídeos podem ser expressos “fusionados” à uma etiqueta. O termo “etiqueta” ou o termo em inglês “*tag*” refere-se a sequências codificadoras incorporadas próximas ao sítio múltiplo de clonagem de um vetor de expressão, possibilitando a sua tradução concomitante e adjacente à sequência do polipeptídeo recombinante clonada. Assim, a etiqueta é expressa fusionada ao polipeptídeo recombinante. Tais etiquetas são bem conhecidas no estado da técnica e incluem compostos e peptídeos como poli-histidina, poli-arginina, FLAG, glutationa-S-transferase, proteína ligante a maltose (MBP), domínio ligante a celulose (CBD), Beta-Gal, OMNI, tioredoxina, NusA, mistina, domínio ligante a quitina, cutinase, compostos fluorescentes (como GFP, YFP, FITC, rodamina, lantanídeos), enzimas (como peroxidase, luciferase, fosfatase alcalina), compostos quimioluminescentes, grupos biotinila, epítomos reconhecidos por anticorpos como zíper de leucina, c-myc,

domínios ligantes a metais e sítios de ligação para anticorpos secundários.

[00101] Os polipeptídeos também podem ser obtidos sinteticamente usando métodos conhecidos na arte. Síntese direta dos polipeptídeos da invenção pode ser realizada usando síntese em fase sólida, síntese em solução ou outros meios convencionais, utilizando geralmente grupos de proteção do α -aminogruppo, da α -carboxila e/ou dos grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos. Por exemplo, na síntese em fase sólida, um resíduo de aminoácido adequadamente protegido é ligado através do seu grupo carboxila a um suporte polimérico insolúvel, tais como uma resina reticulada de poliestireno ou poliamida. Métodos de síntese em fase sólida incluem tanto métodos BOC e FMOC, que utilizam tert-butiloxicarbonil, e 9-fluorenilmetiloxicarbonila como grupos protetores α -amino, respectivamente, ambos bem conhecidos pelos técnicos no assunto (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1995).

[00102] Os seguintes grupos protetores podem ser exemplos utilizados para a síntese dos polipeptídeos da invenção: 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc), tert-butiloxicarbonil (Boc), carbobenziloxi (Cbz), 2-cloro-3-indenilmetoxicarbonil (Clmoc), benz(f)indeno-3-il-metóxicarbonil (Bimoc), 1,1-dioxobenzo[b]tiofeno-2-il-metoxicarbonil (Bsmoc), 2,2,2-tricloroetóxicarbonil (Troc), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonil (Teoc), homobenziloxicarbonil (hZ), 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetóxicarbonil (TCBoc), 1-metil-1-(4-bifenil)etoxicarbonil (Bpoc), 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletoxicarbonil (t-Bumeoc), 2-(2'- or 4'-piridil)etoxicarbonil (Pyoc), viniloxicarbonil (Voc), 1-isopropilaliloxicarbonil (Ipaoc), 3-(piridil)aliloxicarbonil (Paloc), p-metoxibenziloxicarbonil (Moz), p-nitrocarbamato (PNZ), 4-azidobenziloxycarbonyl (AZBZ), Benzil (Bn) MeO, BnO, Metoximetil (Mom), metiltiometil (MTM), fenildimetilsililmetoximetil

(SMOM), t-butildimetilsilil (TBDMS), benziloximetil (BOM), p-metoxibenziloximetil (PMBM), nitrobenziloximetil (NBOM), p-anisiloximetil (p-AOM), pBuOCH₂O-, 4-penteniloximetil (POM), 2-metoxietóximetil (MEM), 2-(trimetilsilil)etoximetil (SEM), mentoximetil (MM), tetrahidropiraniil (THP), -OCOCOPh, Acetil, ClCH₂CO₂-, -CO₂CH₂CCl₃, 2-(Trimetilsilil)etil (TMSE), 2(p-toluenosulfonil)etil (Tse). (Greene T.W. Wuts P.G.M., Protective groups in organic synthesis, 3rd ed., John Wiley & Sons, INC, Nova York, EUA, 1999).

[00103] Após a reação química, os polipeptídeos podem ser separados e purificados por um método de purificação conhecido. Um exemplo de tais métodos de purificação pode incluir uma combinação de extração por solvente, destilação, cromatografia por coluna, cromatografia líquida, recristalização e similares.

[00104] Em uma concretização preferida, o método para produzir o polipeptídeo da presente invenção compreende as etapas de:

(a) transformar uma célula hospedeira um polinucleotídeo da presente invenção para obter uma célula hospedeira transformada;

(b) cultivar a célula hospedeira transformada para a produção do polipeptídeo;

(c) isolar o polipeptídeo da presente invenção da célula ou do meio de cultura circundando dita célula.

[00105] Em uma modalidade, o polinucleotídeo da etapa (a) codifica o polipeptídeo compreendendo pelo menos 90% de identidade com qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9.

[00106] Em outra modalidade, o polinucleotídeo da etapa (a) compreende a sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 e 10 e suas degenerações.

[00107] Em uma modalidade, a transformação da célula hospedeira com o polinucleotídeo da presente invenção é realizada por meio de um vetor de

expressão. Em uma modalidade específica, o vetor é pET28a e a célula hospedeira transformada é *E. coli*.

[00108] As condições de cultivo da célula hospedeira referido na etapa (b) são de conhecimento de um técnico no assunto. Em uma concretização, o cultivo é feito em meio LB na presença de um antibiótico, sob agitação. Em uma modalidade específica, o antibiótico é canamicina. O cultivo pode ser realizado a diferentes temperaturas durante diferentes períodos de tempo. Em uma modalidade específica, o cultivo pode ser feito por cerca de 4 a cerca de 16 horas, a uma temperatura de cerca de 16°C a cerca de 37°C. Em uma concretização preferida, o cultivo é feito a 37°C por 16 horas, sob agitação.

[00109] A produção do polipeptídeo referida na etapa (b) pode ser realizada com qualquer técnica conhecida no estado da técnica. Em uma concretização, a indução da expressão dos polinucleotídeo da invenção é feita por meio de adição de IPTG ao meio de cultura, após obtenção de densidade óptica adequada.

[00110] Em uma etapa opcional, é realizada a solubilização de corpos de inclusão antes do isolamento do polipeptídeo da etapa (c). A solubilização pode ser realizada com qualquer agente caotrópico conhecido no estado da técnica, sendo exemplos não limitativos a ureia e a guanidina. Em uma concretização, a solubilização é realizada com tampão contendo guanidina.

[00111] O isolamento do polipeptídeo referido na etapa (c) pode ser realizado com qualquer técnica conhecida no estado da técnica. Em uma concretização, a purificação é feita por técnicas de cromatografia. Em uma modalidade específica, a purificação é realizada por cromatografia de afinidade. Exemplos não limitativos incluem o método de afinidade à resina de níquel, troca iônica, outros métodos por afinidade ou adsorção, par iônico, fase reversa e exclusão molecular.

[00112] Os sistemas de expressão e purificação desenvolvidos nesta invenção permitiram a obtenção abundante dos antígenos citados por meio de

apenas uma etapa cromatográfica (cromatografia por afinidade). Esta característica foi especialmente relevante no que se refere à qualidade dos imunoenaios, pois anticorpos anti-*E. coli* estão presentes no soro humano, todavia, podem interagir com proteínas de *E. coli* que, porventura, tenham sido purificadas juntamente, com os antígenos desenvolvidos no trabalho, gerando resultados falso-positivos.

[00113] Além disso, essas proteínas contaminantes podem competir com os antígenos de interesse pelos sítios de ligação nas fases sólidas dos imunoenaios (microesferas), o que pode acarretar a perda de desempenho do ensaio. Altos níveis de pureza são também importantes para a estabilidade dos antígenos, pois entre os contaminantes de *E. coli* existem muitas enzimas proteolíticas que causam a degradação dos antígenos expressos. Os resultados apresentados para os ensaios revelam a característica de pureza para os antígenos purificados.

[00114] Ao comparar os rendimentos obtidos na presente invenção com os rendimentos de referências do estado da técnica para a obtenção de proteínas para o vírus da hepatite C, pode-se afirmar que os rendimentos obtidos para purificação das proteínas desenvolvidas podem ser considerados altos. O estado da técnica aponta para rendimentos inferiores para a maior parte das proteínas desenvolvidas para o diagnóstico da hepatite C. Deste modo, pode-se afirmar que os polipeptídeos desenvolvidas nesta invenção, expressas em *Escherichia coli*, apresentaram rendimentos entre 8 a 25 mg por litro de cultura que se apresentaram com 95% de pureza utilizando apenas um passo cromatográfico, o que é vantajoso e considerado satisfatório tendo como objetivo uma produção em larga escala para aplicação diagnóstica.

[00115] Em um sétimo aspecto, a invenção provê uma composição, compreendendo um, dois, três, quatro ou cinco dos polipeptídeos da invenção.

[00116] Em um aspecto particular, a composição é utilizada como reagente para métodos para triagem imunológica de HCV e diagnóstico de hepatite C.

[00117] Adicionalmente, são providas composições estabilizadas dos antígenos da presente invenção. As composições estabilizadas resultam na ausência de agregados proteicos, o que garante a não interferência na interação antígeno-anticorpo, relacionada à agregação, nos imunoenaios da presente invenção.

[00118] Em um aspecto particular da presente invenção, são providas formulações de tampões de armazenamento para estabilização dos antígenos da invenção. Os componentes dos tampões utilizados na presente invenção são conhecidos na arte. Em uma modalidade específica, o tampão de armazenamento compreende ureia. Em uma concretização preferida, o tampão de armazenamento compreende ureia 4M.

[00119] A *Luminex Corporation* recomenda testar diferentes concentrações das proteínas de interesse em diferentes tampões quando se deseja otimizar uma reação através da plataforma de microfluídica e observar a sua funcionalidade. Dentre eles, o tampão de armazenamento das proteínas contendo 4M de ureia, que foi o tampão que se revelou mais adequado para o acoplamento, por evitar a precipitação ou a formação de agregados entre as microesferas acopladas. Assim, desenvolver proteínas para o HCV para uso em imunodiagnóstico que se mantenham estáveis em tampão contendo até 4M de ureia também foi um resultado atrativo para a presente invenção, pois sendo a ureia considerada possível interferente em testes para diagnósticos quando utilizada em altas concentrações, observou-se que baixas concentrações do agente, durante o acoplamento, podem não interferir significativamente nos resultados. Neste contexto, embora a *Luminex Corporation* notifique que a ureia pode potencialmente interferir no acoplamento das proteínas às microesferas, a partir dos resultados obtidos nesta invenção, foi alcançado os

melhores desempenhos, melhores áreas abaixo da curva (AUC, do inglês *Area Under Curve*), menores desvios para os soros negativos e ainda a maior capacidade de separação (SNR, do inglês *Signal to Noise Ratio*) para as proteínas 1, 2 e 3, a partir dos ensaios cujos antígenos foram acoplados às microesferas na presença de tampão contendo 4M ureia. Portanto, o acoplamento na presença de ureia foi essencial para manter a apresentação dos epítomos de interesse.

[00120] Um grande número de proteínas comerciais disponíveis no mercado para aplicação no diagnóstico laboratorial para o vírus da hepatite C estão disponíveis para venda em tampões de armazenamento contendo ureia com concentrações que variam de 6 a 8M.

[00121] Os atuais ensaios licenciados comercialmente para o vírus da hepatite C (VHC) utilizam proteínas recombinantes contendo epítomos lineares. Há provas, no entanto, que os epítomos conformacionais para HCV seriam mais imunorreativos. Por outro lado, é extremamente difícil a obtenção de proteínas recombinantes para HCV na forma solúvel quando a expressão se dá em *E. coli*.

[00122] A única informação de conhecimento dos inventores da presente invenção sobre ensaios de acoplamento que levam ureia são ensaios *multiplex* para avaliarem respostas de anticorpos contra doenças parasitárias de importância para a saúde pública no Camboja, para a pesquisa de anticorpos anti-imunoglobulina G contra antígenos recombinantes de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, *Wuchereria bancrofti*, *Toxoplasma gondii*, *Taenia solium* e *Strongyloides stercoralis*, cujos acoplados às microesferas foram realizados na presença de até 2M de ureia. Ainda não há relatos, na literatura científica para ensaios realizados na plataforma LUMINEX utilizando 4M de ureia para o acoplamento.

[00123] Em modalidades específicas da invenção foram também determinadas as concentrações não agregantes de antígeno. Deste modo, as concentrações dos antígenos da presente invenção na composição variam, de

um modo geral, de 0,007 a 0,015 mg/mL, preferencialmente, de 0,02 a 1? mg/mL.

[00124] Em um oitavo aspecto, a invenção provê um kit para triagem imunológica de HCV e/ou diagnóstico de hepatite C que compreende um, dois, três, quatro ou cinco dos polipeptídeos da presente invenção.

[00125] Opcionalmente, o kit compreende ainda instruções de uso e um controle de reação.

[00126] Em uma modalidade, o controle de reação é um controle de reação positivo.

[001] Adicionalmente, 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.

[002] 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.

[00127] Em uma modalidade, os kits são desenvolvidos para uso em imunoenaios. Em uma modalidade mais específica, os imunoenaios são do tipo ELISA ou LUMINEX.

[00128] Em um nono aspecto, a invenção provê o uso de um ou mais dos polipeptídeos ou da composição ou do kit como aqui descritos para triagem imunológica de HCV e/ou para diagnóstico de hepatite C.

[00129] A invenção ainda provê métodos para triagem imunológica de HCV e para o diagnóstico de hepatite C que envolvem as etapas de:

(a) prover um ou mais polipeptídeos como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou uma composição como definida na reivindicação 11 ou 12;

(b) contatar os ditos um ou mais peptídeos ou a dita composição com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições

suficientes para formação de complexos anticorpo/antígeno; e

(c) detectar o complexo antígeno/anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/anticorpo.

[00130] Em uma concretização preferencial, é realizado o modelo de imunoenensaio indireto. Ainda mais preferencialmente, o imunoenensaio é ensaio ELISA ou ensaio LUMINEX.

[00131] Em uma modalidade, para os ensaios ELISA, são aplicados de 2,5 a 1.000 ng de antígeno por poço. Em uma modalidade específica, são aplicados de 20 a 50 ng de antígenos por poço.

[00132] Em uma modalidade, para ensaios LUMINEX, são aplicadas concentrações de acoplamento de 7,5 a 25 µg/mL. Em uma modalidade específica, são aplicadas concentrações de acoplamento de 7,5 a 15 µg/mL.

[00133] No contexto da presente invenção, os imunoenaios podem ser realizados em formato *singleplex* ou *multiplex*.

[00134] Os antígenos foram avaliados quanto aos melhores desempenhos a partir da AUC (Área Abaixo da Curva) da curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*), da maior sensibilidade e especificidade, maior capacidade de separação, bem como o menor desvio padrão para as amostras negativas.

[00135] Todas as proteínas desenvolvidas apresentaram ótimos desempenhos e capacidade de separação entre os soros negativos e positivos e todas elas foram avaliadas individualmente e em conjuntos. Todos os antígenos confirmaram antigenicidade demonstrando sensibilidade de até 100%.

[00136] Nos ensaios realizados no formato ELISA para a análise individual de desempenho para os antígenos, a melhor sensibilidade e especificidade (100%) foi alcançada para o antígeno 3. Dos desempenhos apresentados, o índice de reatividade para os soros positivos foi, em geral, acima de 12 e para os soros negativos, abaixo de 0,8.

[00137] Nos ensaios LUMINEX formato *singleplex*, foram obtidos 100% de sensibilidade e especificidade para os antígenos 1, 3, 4 e 5 (para o antígeno 2, foi de 95,65%). A maior capacidade de separação entre os soros positivos e negativos foi obtida para o antígeno 4.

[00138] No formato *multiplex*, pode ser empregada a combinação de dois ou mais dos polipeptídeos da presente invenção. Preferencialmente, é empregada a combinação dos cinco polipeptídeos aqui descritos.

[00139] A combinação dos cinco polipeptídeos em ensaio ELISA combinado apresentou sensibilidade e especificidade de 100%, com desempenhos superiores aos obtidos quando os antígenos foram avaliados individualmente no mesmo ensaio. A combinação dos cinco antígenos demonstrou o melhor desempenho e capacidade discriminatória.

[00140] Os resultados obtidos concordam com os dados do ensaio LUMINEX em formato multiplex, dentre os quais as maiores AUCs foram obtidas pela combinação dos cinco polipeptídeos.

[00141] Foi observado que a combinação dos antígenos 2 e 3 (combinação 1), 2, 3, 4 e 5 (combinação 2) e 1, 2, 3, 4 e 5 (combinação 3) apresentaram 100% de sensibilidade. Dentre eles, as combinações 1 e 3 apresentaram também 100% de especificidade. A combinação 3 apresentou a maior capacidade discriminatória entre os soros, com a maior distância entre as MFIs (mediana de fluorescência) para os soros negativos e positivos. Para essa combinação, o IR (índice de reatividade) foi de até 140 vezes maior que o IR obtido para os soros negativos. Esse ensaio demonstrou também o menor desvio padrão para os soros negativos.

[00142] Tanto no ensaio ELISA, quanto no LUMINEX, os sinais de fundo ou *backgrounds* foram considerados baixos. O sinal de fundo acusa a eficiência ou não das etapas de lavagens ou do bloqueio. Este sinal também pode estar relacionado à pureza dos antígenos utilizados na presença de componentes heterólogos que podem causar aumento no sinal de fundo, como

por exemplo, proteínas contaminantes, provenientes da *E. coli*. Uma vez que os ensaios realizados apresentaram sinais de fundo baixos, isto permite concluir que a obtenção dos antígenos a partir de uma única etapa cromatográfica nesta invenção, foi suficiente para obtenção de proteínas com um grau de pureza alto, confirmou eficiência das etapas de lavagens durante os ensaios e do bloqueio adicional realizado com o extrato de *E. coli*.

[00143] Semelhantemente à avaliação dos ensaios realizados em formato *singleplex*, a aplicação de conjuntos de antígenos permitiu a obtenção de 100% de sensibilidade e especificidade. No entanto, a probabilidade de positividade e capacidade de diferenciação da infecção dos soros positivos pelos soros negativos, obtidos pelo SNR foi consideravelmente superior nos ensaios em combinação de antígenos.

[00144] Dentre todos os conjuntos testados, a combinação composta pelos cinco antígenos demonstrou a melhor performance, apresentando uma capacidade discriminatória equivalente a 36 vezes a capacidade de separação obtida pelo antígeno quimérico comercial utilizado como controle do ensaio, (ProsPec), o menor desvio padrão dentre as amostras negativas e a maior separação entre os valores de MFI e IR entre as amostras negativas e as positivas. O ensaio também não demonstrou nenhuma reação cruzada após testes realizados com soros positivos para HIV, HTLV, HBV, Sífilis e Chagas.

[00145] Além disto, a condição ótima do conjunto de proteínas foi alcançada fazendo uso de baixas concentrações de proteínas para o acoplamento. As concentrações utilizadas na presente invenção são, consideravelmente, inferiores às concentrações de acoplamentos utilizadas para os antígenos comerciais como, por exemplo, a proteína comercial utilizada como controle do ensaio.

[00146] A capacidade discriminatória dos ensaios através da plataforma LUMINEX foi superior ao ELISA em todos os aspectos AUC (95% IC), capacidade de separação entre as amostras e probabilidade de positividade

através do IR e SNR. O sistema LUMINEX apresenta muitas vantagens dentre as quais a cinética de reação na superfície carboxilada das microesferas magnéticas de poliestireno é superior à cinética de reação de outros métodos. Dentre as vantagens que o ensaio LUMINEX apresenta sobre o ELISA, a capacidade de multiplexação, é considerada na técnica como a mais atrativa.

[00147] Apesar do desafio de padronizar um ensaio *multiplex* do ponto de vista de desenvolvimento de imunodiagnósticos esta característica fornece economia de tempo, de processamento de um número maior de amostras e volumes menores de reagente e soros. Uma vez que no ELISA isto é realizado em triplicata, enquanto no LUMINEX, cada microesfera lida, corresponde a uma amostragem diferente e são lidas 100 microesferas por poço, não havendo a necessidade de repetições para o ensaio. Portanto, esta invenção fornece antígenos com características compatíveis para aplicação no desenvolvimento de imunoenaios dentro de uma plataforma moderna e automatizada.

[00148] Os marcadores sorológicos utilizados em bancos de sangue devem ser altamente confiáveis, apresentarem boa reprodutibilidade e máxima sensibilidade e especificidade. Um outro fator importante para a implementação de novos marcadores neste tipo de laboratório é que o *cut-off* para os ensaios empregados devem ser mais baixos, com o objetivo de aumentar a sensibilidade. Esta estratégia visa garantir a segurança do receptor, pois objetiva evitar a transfusão de bolsas de sangue de doadores infectados que apresentem baixos títulos para os marcadores. O conjunto de proteínas da combinação 4, foi o conjunto que apresentou o menor ponto de corte dentre todos os ensaios realizados, *cut-off* igual a 50, com uma probabilidade de positividade superior às demais combinações ou às avaliações das proteínas individualmente.

[00149] A presente invenção revelou antígenos que promoveram altos níveis de discriminação sorológica, obtendo-se ensaios com 100% de especificidade para um total de 165 soros negativos testados para HCV e sem

a presença de reação cruzada, o que conta positivamente para a aplicação diagnóstica dos mesmos.

[00150] 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: Clonagem das sequências codificadoras em vetor de expressão

[00151] As sequências nucleotídicas de interesse foram sintetizadas e sofreram um processo de otimização para a substituição dos códons raros, distribuição de conteúdo GC e remoção de sequências repetitivas visando a transcrição e estabilidade e tradução do mRNA visando a obtenção de altos níveis de expressão em sistema procarioto. Foram também projetadas para receberem duas combinações de sítios de restrição Bam HI/Hind III e Nco I/Eco RI em suas extremidades visando a subclonagem no vetor de expressão pET28a de modo a permitir o posicionamento da hexa-histidina na região N-terminal ou C-terminal.

[00152] Entre os sítios de restrição foram adicionados nucleotídeos espaçadores que colocam a sequência codificante da proteína em fase de leitura e um códon de terminação entre os sítios das enzimas Bam HI e Hind III a fim de proporcionar alternativas para a subclonagem. Desta forma, se a clonagem for realizada com estas enzimas, a finalização da transcrição é assegurada e se a subclonagem for realizada com as enzimas Nco I e Eco RI, o término de transcrição será determinado pelo códon de terminação do pET28a. As sequências foram clonadas separadamente em vetores de pET28a, sob comando do promotor T7 polimerase, utilizando as enzimas de restrição Bam HI e Hind III posicionando a hexa-histidina na região N-terminal.

[00153] Especificamente com relação aos clones 4.1, 4.5, 4.7 (antígeno 1), 4.8 e 4.9, foi realizada subclonagem por transferência de vetor. Para isolar o inserto, 5µg do vetor pUC57, contendo o polinucleotídeo sintético, foram linearizados com as enzimas Bam HI e Hind III a 37°C, conforme recomendação do fabricante, considerando o volume final da reação de 50 µL. Após visualização e excisão das bandas no gel de agarose 0,8%, os fragmentos foram purificados usando o *kit QIAquick Gel Extraction*® (Qiagen).

[00154] O vetor pET28a foi linearizado por digestão com as enzimas Bam HI e Hind III e teve as extremidades defosforiladas pela Fosfatase Alcalina (FastAp -*ThermoFischer*) a 37°C, conforme protocolo do fabricante e a ligação dos insertos contendo os genes sintéticos foi realizada usando a enzima Ligase T4 (*Thermo Scientific*), a 16°C, por 16h. Uma alíquota do conteúdo da reação de ligação foi utilizado para transformação em *E. coli* DH5α (Promega) por choque térmico e confirmada por análise dos fragmentos no gel SDS-PAGE. O controle da reação de ligação constituiu na adição apenas do pET28a defosforilado e da enzima T4 DNA ligase sem a presença do inserto num tubo. O *Tag* de hexa-histidina foi posicionado na região N-terminal.

[00155] As sequências codificadoras dos antígenos 2 a 5 foram obtidas a partir de amplificação por PCR das regiões NS4 e NS5. Para isso, foram utilizados iniciadores diretos (*forward*) e reversos (*reverse*) (SEQ ID Nos: 11 a 16).

[00156] Especificamente com relação ao antígeno 2, a sequência codificadora do mesmo foi obtida a partir da região “NC+NS4” presente em clone em pUC57 (clone 4.5). Posteriormente, o produto de amplificação foi inserido no vetor pET28a utilizando as enzimas Bam HI e Hind III. Foram utilizados os iniciadores de SEQ ID NOs: 11 e 12 para amplificar a região NC+NS4.

[00157] Especificamente com relação ao antígeno 3, a sequência codificadora do mesmo foi obtida por amplificação a partir da região NS5 (clone 4.5) e fusionada no C-terminal de plasmídeo pET28a+NS3 (clone 4.1) utilizando as enzimas Eco RI e Hind III. Foram utilizados os iniciadores de SEQ ID Nos: 13 e 14.

[00158] Especificamente com relação ao antígeno 4, a sequência codificadora do mesmo foi obtida pelo isolamento da região NS4 de plasmídeo pUC57 (clone 4.5 ou 4.11) e o produto amplificado e digerido foi ligado a plasmídeo pET28a+NS3 (clone 4.1) utilizando as enzimas EcoR I e Hind III. Foram utilizados os iniciadores de SEQ ID Nos: 15 e 16 para isolar a região NS4.

[00159] Especificamente com relação ao antígeno 5, a sequência codificadora do mesmo foi obtida pela utilização dos iniciadores de SEQ ID Nos: 15 e 16 para amplificar a região NS5 (clone 4.5) e fusioná-la no C-terminal de plasmídeo pET28a+NC (clone 4.2) utilizando as enzimas EcoRI e Hind III.

[00160] A reação de amplificação foi realizada com 1U da *Taq Platinum High Fidelity* (Invitrogen) e com 20 a 40ng de DNA plasmidial *template*. A reação foi realizada atentando-se para a temperatura de dissociação (T_m) dos *primers*. Confirmados os tamanhos dos fragmentos amplificados por gel de agarose 0,8%, estes foram purificados usando o kit de purificação para produto da PCR da Qiagen. A seguir, as extremidades das sequências foram digeridas com as enzimas Bam HI e Hind III para gerarem extremidades coesivas e obter a ligação no vetor pET28A linearizado na presença da T4 Ligase, a 16°C por 16h.

1.1. Seleção dos clones positivos

[00161] Com relação ao antígeno 1, após a transformação foi necessário confirmar a positividade dos clones para as colônias que cresceram em meio LB com canamicina (25µg/mL). Aleatoriamente, foram selecionadas dez

colônias que, com o auxílio de uma alça de platina, foram transferidas para 5mL de meio líquido LB contendo o antibiótico. Após a propagação bacteriana, por 16h, a 37°C, a biomassa foi coletada e o DNA plasmidial extraído por lise alcalina. A presença do inserto foi confirmada por digestão com as enzimas de restrição Bam HI e Hind III e análise das digestões em gel de agarose 0,8 % após digestão enzimática.

[00162] A seleção das colônias positivas para os antígenos 2 a 5 foi realizada por PCR de colônia. Para isto, as colônias escolhidas de forma aleatória foram coletadas com o auxílio de um palito estéril e transferidas para um tubo do tipo *Eppendorf* contendo 20µL de água. Os tubos foram incubados por 10 minutos a 95°C para a lise das células e apenas 1µL deste material foi adicionado a um tubo do tipo *Eppendorf* contendo uma solução MIX para a reação da PCR no volume final de 20µL. As condições de amplificação foram as mesmas determinadas para a obtenção da sequência do inserto.

1.2. Estoque de colônias positivas transformadas

[00163] As colônias positivas foram cultivadas em 5mL de meio líquido LB contendo canamicina (25µg/ml), crescidas sob agitação a 37°C por 16h. Foram realizadas alíquotas deste material em tubos do tipo *Eppendorf* contendo 200µL de glicerol (60%) na proporção 1:2. Os tubos foram identificados e armazenados em freezer a -80°C. Adicionalmente, placas de Petri contendo as colônias do clone positivo foram mantidas a 4°C por até um mês para uso imediato. Quando necessário, os tubos armazenados a -80°C, contendo as células em glicerol, foram retirados para a manutenção das células no refrigerador.

EXEMPLO 2: Expressão dos polipeptídeos recombinantes

[00164] Os polipeptídeos demonstraram altos níveis de expressão na cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) cultivada em meio líquido LB (Luria Bertani -

10g Triptona, 5g Extrato de Levedura e 5g NaCl/L).

[00165] Estabelecidas as condições ideais para a expressão das proteínas, foram realizados cultivo em volumes acima de 1L de cultura que foram obtidos a partir de 25mL de um pré-inóculo do transformante positivo crescido por 16h a 37°C, sob agitação (250 rpm) e transferido para um frasco *Erlenmeyer* de 2L contendo 500mL de meio LB suplementado com antibiótico. As células foram cultivadas até a obtenção da densidade óptica de 0,6-0,8 nm quando foi adicionado 1mM de IPTG. O cultivo prosseguiu por mais quatro horas. Ao final da expressão, a biomassa foi gentilmente coletada por centrifugação a 5.000 rpm, 15 minutos, sob refrigeração (4°C) e o sobrenadante descartado. A células foram lavadas com 100mL de PBS 1 X e novamente centrifugada. O sobrenadante foi descartado e a biomassa pesada. O peso da biomassa foi anotado a fim de avaliar o rendimento da expressão para cada proteína após a etapa de purificação. O material pôde ser armazenado a -20°C até o momento do uso.

[00166] Os polipeptídeos foram expressos na forma de corpos de inclusão, cujas análises por gel SDS-PAGE 13% revelam que as posições das bandas, após a eletroforese, correspondem aos tamanhos esperados para as construções (Figura 01).

EXEMPLO 3: Lise das células e tratamento dos corpos de inclusão

[00167] À biomassa, foi adicionado Tampão de Lise contendo 50mM de fosfato de sódio pH 7,4, 300mM de NaCl, 5% de glicerol, 0,05% Tween 20, 7mM β -mercaptoetanol (β -ME) e inibidores de proteases (1mM PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*) e coquetel inibidor de proteases da Roche (1 comprimido/10ml de tampão)) na proporção de 3-4mL de tampão para cada 1g de célula. Os tampões foram avaliados de acordo com o pI de cada proteína, bem como a necessidade da adição de agentes redutores, detergentes ou glicerol na tentativa de manter a estabilidade ou a solubilização das mesmas. A lise das

células para volumes pequenos de cultura (25-50mL) foi realizada usando o reagente *FastBreak Cell Lysis Reagent* da Promega de acordo com a descrição do fabricante, seguida de dois ciclos de sonicação usando o equipamento ultrassônico *Cole Parmer processor* a 40% de amplitude, 30 segundos *on* e um minuto *off* ou adicionando 200µg/mL de Lisozima aos tubos contendo as células e incubando-os por até 30 minutos em tampão contendo 50mM fosfato de sódio pH 7,4, 300mM NaCl, 5% glicerol, 0,05% Tween 20 e 7mM β-mercaptoetanol (β-ME).

[00168] Além disto, aos tampões foram adicionados inibidores de proteases como o 1mM de PMSF e o coquetel inibidor de proteases da Roche. Após incubação, a ruptura da parede das células se deu por sonicação utilizando o equipamento ultrassônico da *Cole Parmer processor* por seis ciclos de lise a uma amplitude de 40%, 30 segundos de pulso e 60 segundos de intervalo a 4°C. O extrato foi clarificado por centrifugação (20 minutos, 4°C, a 20.000 g).

[00169] A lise de biomassa a partir de cultivos para volumes acima de 1L foi realizada no equipamento microfluidificador (Microfluidics Corporation, USA) utilizando uma pressão de aproximadamente 80 *Psi* em banho de gelo. As células foram ressuspensas em Tampão de Lise (50 mM fosfato de sódio pH 7,4, 300mM NaCl, 5% glicerol, 0,05% Tween 20, 7mM β-mercaptoetanol (β-ME) e inibidores de proteases) utilizando 3-4mL de tampão para cada 1g de células.

3.1: Tratamento dos polipeptídeos expressos na forma de corpos de inclusão e solubilização

[00170] Após a lise das células, os sedimentos das centrifugações contendo os corpos de inclusão foram coletados e o material tratado para a clarificação dos corpos de inclusão. Para isto, foi adicionado aproximadamente 7mL de tampão contendo 50mM de fosfato de sódio pH 7,4, 300mM NaCl, 5% glicerol, 1% de Tween 20, 2% de Triton-X 100, 7mM de β-ME e inibidores de

proteases para cada 1 grama de biomassa. O material foi sonicado utilizando o equipamento ultrassônico com amplitude de 40% em 6 ciclos de 30 segundos e intervalo de 30 segundos em banho de gelo. Na sequência, o material foi centrifugado a 20.000g por 30 minutos e, novamente, levado ao equipamento ultrassônico com tampão composto por 50mM de fosfato de sódio pH 7,4, 300mM NaCl, 7mM de β -ME com o objetivo de retirar resquícios do Triton X-100 presente no tampão anterior. Os corpos de inclusão foram recuperados por centrifugação e armazenados a -20°C até o momento do uso.

[00171] Para a solubilização, aos corpos de inclusão, descongelados, foi adicionado tampão de solubilização composto por 8M uréia, 7mM β -ME, 150mM NaCl, 1-20mM Ditioneitol (DTT), 1mM PMSF ou 6M Guanidina, 7mM β -ME, 150mM NaCl, 1-20mM Ditioneitol (DTT) e 1mM PMSF na proporção de 3 a 7mL de tampão por grama de material que foi incubado à temperatura ambiente por até 16h fazendo uso de um agitador do tipo orbital (20 rotações por minuto). Ao final da incubação, seguiu-se com uma curta sonicação de três ciclos, usando 40% de amplitude por 10 segundos de pulso e 30 segundos de intervalo em banho de gelo e centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante recolhido e encaminhado para a purificação.

[00172] Foi obtida a solubilização das proteínas em tampão contendo 6M Guanidina, o que permitiu reverter a afinidade das proteínas à coluna e obter as amostras purificadas (vide Figura 6.4, gel C ou D) e as eluições foram obtidas em tampão contendo 4M de uréia e 500 mM de imidazol.

3.2: Retirada da ureia ou guanidina das frações das proteínas solúveis

[00173] Uma vez que a ureia e a guanidina são agentes incompatíveis com as técnicas de SDS-PAGE e *Western Blotting*, fez-se uso do protocolo descrito por Palmer e Wingfield (2004), no qual 20 μL das alíquotas de proteínas solubilizadas ou frações purificadas receberam 180 μL de etanol

100%, previamente resfriado (4°C). A mistura foi agitada em um vórtex e incubada por 10 minutos a -20°C ou por 5 minutos a -80°C. Seguiu-se com a centrifugação dos tubos por 5 minutos a 15.000 g, 4°C. O sobrenadante foi retirado gentilmente e o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de etanol 90% gelado. O tubo foi vigorosamente agitado usando o vórtex e uma nova centrifugação de 5 minutos a 15.000g foi realizada a 4°C. Nesta etapa, as proteínas são precipitadas pela ação do etanol e o sobrenadante deve ser descartado.

[00174] O tubo contendo a proteína precipitada foi mantido à temperatura ambiente por alguns minutos para a completa evaporação do etanol. A ressolubilização das proteínas foi realizada após a adição de 6µL de água destilada e 4µL de tampão de corrida (1X) aos tubos que foram aquecidos a 95°C e cujas frações foram analisadas por gel SDS-PAGE ou *Western Blotting*.

EXEMPLO 4: Purificação dos polipeptídeos

[00175] A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em condições desnaturantes em tampão A contendo 6M de guanidina, 100mM de fosfato, 10mM de Tris-HCl (pH 7.5), 7mM de β-mercaptoetanol, 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) para ligação e tampão B contendo 4M de ureia, 100mM de Fosfato, 10mM de Tris-HCl (pH 7.5), 7mM de β-mercaptoetanol, 500mM de Imidazol, 1mM de PMSF para a diluição, utilizando a coluna Ni-NTA de 1 ou 5mL da GE no equipamento ÄKTA purifier 100, cromatógrafo semi-automatizado.

[00176] Os procedimentos de purificação empregados foram:

Fluxo: 1mL/min

Etapa 1: Tampão A, 10 VC

Gradiente: Etapa 2: 0 a 10% de tampão B, 10 VC,

Etapa 3: 10 a 100% de B

[00177] A composição dos tampões (mostrados na Tabela 2) e

parâmetros de purificação utilizados resultaram em maiores rendimentos e na obtenção de proteínas mais puras. A solubilização das proteínas ocorreu em tampão A, com a adição de 1 a 20mM de DTT, overnight sob agitação (29 rotações/minuto), temperatura ambiente.

Tabela 2: Composição dos tampões utilizados para a padronização de purificação de proteínas. Todos os tampões receberam inibidores de proteases como o 1 mM de PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*), coquetel inibidor de proteases (Roche) e 7 mM de β -mercaptoetanol (β -ME).

	Tipo de proteína	Tipo de Resina	Tampão A (para ligação)	Tampão B (Para eluição)
Purificação em pequena escala ou por HPLC	Solúvel	Ni-NTA	50mM Tris-HCl pH 8,0 ou 7.5, 300mM NaCl, 7mM β -ME, 1 mM PMSF	50mM Tris-HCl pH 8,0, 300mM NaCl, 7mM β - ME, 500mM Imidazol, 1mM PMSF
		Troca iônica	10mM HEPES pH 8,5, 300mM NaCl, 20mM imidazol, 7mM β - ME, 1% Tween 20, 10% glicerol, 1mM PMSF	10mM HEPES pH 8,5, 300mM NaCl, 500mM imidazol, mM β -ME, 1% Tween 20, 10% glicerol, 1mM PMSF
	Insolúvel	Ni-NTA	100mM Fosfato pH 7.5, 10mM Tris-HCl, 7mM β - ME, 1mM PMSF	100mM Fosfato pH 7.5, 10mM Tris-HCl, 7mM β -ME, 500mM NaCl, 1mM PMSF
			6M Guanidina, 100mM Fosfato, pH 7.5, 10mM Tris-HCl, 7mM, β -ME, 1mM PMSF	4M Uréia, 20mM Fosfato, pH 7,5, 1M NaCl, 7mM β -ME, 1mM PMSF

			50 mM Fosfato de sódio pH 7,4, 4M uréia, 150 mM NaCl, 7 mM β -ME, 1m MPMSF	4M Uréia, 100mM Fosfato, 10mM pH 7.5, Tris-HCl, 7mM β -ME, 500mM Imidazol, 1mM PMSF
Tampão de solubilização	Insolúvel		6M de Guanidina, 100mM Fosfato pH 7.5, 10mM Tris-HCl, 7mM β -ME, 1mM PMSF, 1-25mM DTT 8M Uréia, 100mM Fosfato pH 7.5, 10mM Tris-HCl, 7mM β -ME, 1mM PMSF, 1-25mM DTT	-
Tampão de armazenamento	Insolúvel		4M Uréia, 20mM Fosfato, pH 7.5, 50mM NaCl, 7mM β -ME, 1mM PMSF	-

[00178] Antes de ser aplicada à resina de níquel, os antígenos foram diluídos até concentrações inferiores à 5mM de DTT (por questão de incompatibilidade com a técnica cromatográfica por afinidade) e filtrados.

[00179] As proteínas não foram purificadas na presença de tampão contendo ureia 8M. A ligação entre as proteínas solubilizadas e a resina contendo níquel foi obtida apenas na presença de tampão contendo 6M de guanidina. A substituição do agente desnaturante foi fundamental para a eficiência de ligação das proteínas à resina de níquel, o que permitiu a purificação das mesmas. O motivo pelo qual isto ocorreu pode estar relacionado à falta de exposição do Tag de hexa-histidina.

[00180] Os rendimentos obtidos com os sistemas de expressão e purificação da presente invenção corresponderam à obtenção de 10 mg/L para

o Antígeno 1, 8,4mg/mL para o Antígeno 2, 24mg/L para o Antígeno 3, 18mg/L para o Antígeno 4 e 9,6 mg/mL para o Antígeno 5 que apresentaram pureza acima de >95%, conforme mostra a Figura 1.

[00181] As estimativas para os rendimentos de cada proteína foram determinadas a partir da quantificação final, obtida através das dosagens das frações mais puras e aproveitáveis, em gramas, após a purificação. Frações impuras com presença de contaminantes não foram utilizadas para o cálculo de rendimento.

[00182] Estas informações foram registradas e os rendimentos relativos por litro de cultura foram estipulados: Antígeno 1 (10mg), Antígeno 2 (8,4mg), Antígeno 3 (24mg), Antígeno 4 (18mg), Antígeno 5 (9,6mg). As proteínas demonstraram altos níveis de pureza (> 95%).

EXEMPLO 5: Análise dos polipeptídeos

[00183] Análises *in silico ProtParam* das sequências de SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9 identificaram parâmetros teóricos bioquímicos, conforme demonstrado na Tabela 3. Para essas análises, foram consideradas a sequência de 34 aminoácidos codificados pela sequência de nucleotídeos do vetor pET28a em fase com o a sequência do linker e a sequência dos antígenos (sequência traduzida: MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGS + *poly-linker* MAGS).

Tabela 3: Parâmetros obtidos a partir da análise *in silico* das sequências aminoacídicas para os polipeptídeos.

Parâmetros	Antígeno 1 SEQ ID NO: 1	Antígeno 2 SEQ ID NO: 3	Antígeno 3 SEQ ID NO: 5	Antígeno 4 SEQ ID NO: 7	Antígeno 5 SEQ ID NO: 9
nº de aa	402	297	516	550	334
MW	43,8	32	54,4	57	36
pI	9,6	10,8	6,8	6,8	10
Coef. de extinção	66	45	37,8	38	54

nº de aa = número de aminoácidos; MW = massa molecular; pI = ponto isoelétrico; Coef. de extinção = coeficiente de extinção.

EXEMPLO 6: Formulação dos tampões de armazenamento para estabilização das proteínas

[00184] O tampão de armazenamento foi definido após experimentos com o objetivo de prevenir perdas por precipitação, manter a estabilidade das proteínas e retirar resquícios de ureia, guanidina ou imidazol e diminuir a concentração do sal, uma vez que estes agentes podem agir como interferentes para as técnicas de imunoenaios a serem empregadas. Assim, o tampão de armazenamento para os antígenos, após purificação foi composto por 4M de ureia, 10mM de Fosfato de sódio (pH 7,5), 20mM de NaCl, 7mM de β -mercaptoetanol, 1mM de PMSF.

[00185] As análises de estabilidade e integridade das proteínas foram realizadas pós-descongelamentos, durante o período de 12 meses, dos quais, periodicamente, tubos contendo 200uL de proteínas em concentrações que variaram 1,5 a 3 mg/mL foram mantidas a -20°C em tampão de estoque.

[00186] Durante este período, foram realizados três descongelamentos pontuais, a cada três meses, em banho de gelo a fim de avaliar a integridade destas proteínas em gel SDS-PAGE (13%), o que demonstrou a preservação das mesmas. Adicionalmente, após este período e descongelamentos, as proteínas foram avaliadas quando a reprodutibilidade de ensaios (sensibilidade e especificidade) por teste em microesferas, o que acusou desempenho semelhante ao obtido logo após a purificação. Podendo inferir que o tempo de vida das proteínas podem ser superiores ao tempo testado.

[00187] Devido à presença da ureia no tampão de armazenamento, não foi possível quantificar as proteínas por métodos como *Bradford*, BCA (SIGMA, USA) ou através do Qubit® (Qiagen) devido à necessidade de diluições em tampões específicos sem a presença de ureia. Assim, a quantificação das proteínas foi determinada por absorvância a 280 nm no espectrofotômetro Nanodrop 2000 quando as amostras foram diluídas no

tampão de armazenamento, contendo ureia.

[00188] Paralelamente, foi realizado uma análise qualitativa, como controle, através de uma curva contendo concentrações conhecidas de BSA. As medidas foram realizadas utilizando a massa molecular e o coeficiente de extinção molar reduzido de cada proteína, A absorbância do branco foi subtraída pela absorbância das amostras, cujo valor foi multiplicado pelo fator de diluição.

[00189] A análise da integridade das proteínas após 12 meses de uma sequência de descongelamentos que ocorreu a cada três meses e a avaliação da reprodutibilidade do imunoenensaio no final deste período foi realizada. O descongelamento das alíquotas de proteínas foi realizado conforme descrito na metodologia. O gel de SDS-PAGE (13%) para avaliação qualitativa dos antígenos pode ser visualizado na Figura 2 e apresenta pouca presença de degradação, revelando integridade das proteínas. O acoplamento foi realizado após descongelamentos. O imunoenensaio demonstrou reprodutibilidade quanto à sensibilidade e especificidade obtidos previamente, com intervalo de confiança a 95%. Esta avaliação, embora não tenha seguido os padrões do guia de estabilidade para reagentes de diagnósticos *in vitro* chamado de *Clinical and Laboratory Standards Institute* publicado pelo CDC, USA, sugere que os antígenos desenvolvidos podem se manter estáveis por período até superior ao avaliado, mantendo sua capacidade reativa. É possível que a composição do tampão de estoque tenha favorecido esta estabilidade devido ao uso de inibidores de proteases ou pela presença do agente desnaturante ou, até mesmo, devido à sequência de aminoácidos das mesmas. Logo, antígenos estáveis e resistentes a proteases também são atrativos quando existe interesse de aplicação diagnóstica.

EXEMPLO 7: Imunoensaios

[00190] Foi aplicado o modelo de ensaio indireto que consiste no

acoplamento dos antígenos às microesferas ou no revestimento de antígenos às cavidades das microplacas de poliestireno visando a interação destes com anticorpos específicos presentes no soro de indivíduos infectados.

[00191] Foram utilizados controles positivos para as imunorreações usando as proteínas comerciais quiméricas para HCV da Fapon (GECHCV1303, *specificity* Core, NS3, NS4, NS5) e da ProSpec (#HCV-207 *specificity* Core, NS3, NS4 e NS5) ou ainda uma proteína TpN17 para Sífilis.

[00192] Os ensaios passaram por etapas de otimização até a completa padronização com a avaliação da melhor concentração de proteína a ser utilizada no acoplamento ou a massa ideal de antígenos para o revestimento das superfícies das microesferas. Foram avaliados também o tipo de bloqueio e concentração, a diluição de trabalho do soro e do anticorpo secundário, além do tempo estimado para reação.

[00193] No ensaio LUMINEX, foram realizados os bloqueios dos sítios reativos com tampão PBS/TBN utilizado para o armazenamento das microesferas. Este tampão contém 1% de albumina de soro bovino (BSA) que foi responsável por preencher sítios ainda expostos na superfície das microesferas não recobertos pelo antígeno. No ensaio ELISA, o bloqueio foi realizado com 2% de caseína (peso/volume) a partir de leite em pó desnatado.

[00194] Adicionalmente, tanto o ensaio ELISA quanto o LUMINEX receberam 2% do extrato de *Escherichia coli* como um bloqueio adicional, uma vez que as proteínas desenvolvidas haviam sido obtidas por expressão em *E. coli*.

[00195] Em ambos os ensaios, os valores obtidos para o sinal de fundo (ruído) foram subtraídos dos valores obtidos a partir da leitura dos soros.

[00196] Os ensaios imunodiagnósticos tanto pela plataforma de microarranjo quanto por ELISA foram realizados utilizando as proteínas provenientes da purificação pelo equipamento ÄKTA frente ao painel completo de Análise Externa de Qualidade (AEQ), que tem como principal característica

a alta reatividade aos marcadores das doenças.

[00197] O painel AEQ é caracterizado pela FIOCRUZ, INCQS e composto por 192 soros, dos quais 23 são reativos para HCV, 26 para HIV 1/2, 30 HTLV 1/2, 31 HBV, 30 Sífilis, 28 Chagas e 21 soros são negativos para todos os patógenos que compõem o painel (Figura 3).

7.1. Preparo do extrato de *Escherichia coli*

[00198] Partindo do descongelamento de um tubo do tipo *Eppendorf* contendo as células de *E. coli* DH5- α acondicionado a -80°C , foi realizado um pré-cultivo em tubo de ensaio a partir de 2mL de meio líquido LB cultivados a 37°C por 24 horas sob agitação, 250 rpm. O conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para um *Erlenmeyer* contendo 1 litro do meio LB com antibiótico que foram mantidos em cultura até atingir 0,6 a 0,8 de absorvância na densidade óptica (280 nm no espectrofotômetro Ultrospec II®). A biomassa foi centrifugada sob baixa rotação em centrífuga Sorvall® sob refrigeração e lavadas com PBS 1X, pH 7,2. O sobrenadante foi desprezado e o pellet recuperado em 10 ml de tampão PBS. A biomassa foi lisada utilizando o Sonicador Ultrasonic Homogenizer® a 40% de amplitude por três ciclos de 20 segundos *on* e 1 minuto *off* em banho de gelo. O extrato lisado foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore de $0,45\mu\text{m}$, seguida de uma nova filtração em membrana de $0,22\mu\text{m}$. O *pellet* foi descartado e ao extrato foi adicionado 0,1% de uma solução de azida sódica para preservação. Após a quantificação, o material foi aliquoteado em microtubos que foram armazenados a -20°C . A solução de trabalho foi utilizada na concentração de 10 mg/mL diluídos em tampão PBS pH 7.2 e mantidos a 4°C .

7.2. Ensaio do tipo ELISA

7.2.1. Ensaio Simples (*Singleplex*)

[00199] Inicialmente, foram avaliadas as condições ótimas para realização dos ensaios, com o objetivo de avaliar a massa mínima de antígeno (em ng) e obter uma boa separação entre as amostras positivas e negativas. Para cada antígeno, foi realizada uma curva de onze pontos em triplicata onde os poços receberam 2,5, 5, 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 500 e 1.000ng/poço em tampão carbonato-bicarbonato 50mM, pH 9.6 que foi testado contra um pool de amostras reativas para HCV.

[00200] Posteriormente, os ensaios foram realizados com a adição de 50µL do tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 contendo 20ng da proteína de interesse para adesão. A placa foi vedada com filme selante e armazenada a 4°C por 16 horas. Na sequência, o excesso da solução de revestimento foi removido por lavagem com 150µL de PBS-T (3X) e foram adicionados aos poços 100µL de uma solução de bloqueio PBS-T contendo 2% de caseína, a placa foi incubada durante 1 hora a 37°C, sob leve agitação (200rpm).

[00201] Após a incubação, as placas foram lavadas com 150µL de tampão PBS-T (5X) seguida da adição de 50µL do soro previamente diluído (1:100) em tampão PBS-T contendo 2% do extrato de *E. coli*. A placa foi novamente incubada por 40 minutos a 37 °C sob agitação e lavada com 150µL de PBS-T (5X). Por fim, 50µL do anticorpo monoclonal anti-IgG humana conjugado a HRP (SIGMA, USA) diluído 1:5.000 foi adicionado aos poços e a placa incubada, mais uma vez, a 37°C por 1h, 200 rpm. Procedeu-se as etapas de lavagens por 5X, seguida da adição de 50µL do substrato TMB (KPL, USA).

[00202] A reação enzimática ocorreu por 10 minutos e a neutralização foi obtida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico (2M H₂SO₄). As placas foram lidas por um leitor automático (Multiscan, Suécia) no comprimento de onda de 450nm.

[00203] Os resultados obtidos com a avaliação individual dos antígenos pelo formato ELISA foram plotados em um gráfico de dispersão usando o índice de reatividade (Figura 4 e podem ser observados na Tabela 4 abaixo,

onde demonstrou-se que as maiores AUCs (*Area Under Curve*) foram apresentadas pelo Antígeno 3, com 100% de sensibilidade e especificidade, com IC 95% de 100 (1-1.000).

Tabela 4: Parâmetros gerados através das análises de desempenho individual dos antígenos por ensaio ELISA simples.

Ensaio ELISA simples (50 ng)						
	1	2	3	4	5	ProSpec® (10ng)
Área da Curva ROC	0,9916	0,9916	1,000	0,9951	0,9742	0,9858
Cut off	0,012	0,2	0,15	0,21	0,23	0,12
Negativos	164	161	165	159	161	160
Negativos verdadeiros	165	165	165	165	165	165
Positivos	21	22	23	22	21	21
Positivos verdadeiros	23	23	23	23	23	23
Falso positivo	1	4	-	6	4	5
Sensibilidade (%)	91,3	95,65	100	95,65	91,3	91,3
Especificidade (%)	99,39	92,7	100	90,3	89,7	95,15
95% IC (%)	1-1	0,9802- 1,003	1-1	0,9864 -1,004	0,936 -1,012	0,9648 -1,007
p value	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

7.2.2. Ensaios em Combinação (*Multiplex*)

[00204] No ensaio ELISA em combinação de antígenos, as combinações de antígenos foram realizadas em um tubo do tipo *Eppendorf* em tampão carbonato/bicarbonato e cada poço recebeu 50µL desta solução de antígenos contendo 20ng de massa total.

[00205] Foram avaliadas combinações de antígenos mais simples (Antígenos 2, 3, 4 e 5), bem como combinação dos mesmos com o antígeno mais completo (Antígeno 1), conforme mostrado na Tabela 5.

[00206] Enquanto no ensaio ELISA simples apenas um antígeno único recobriu o fundo da microplaca, no ensaio ELISA para avaliar as combinações de antígenos, o fundo da microplaca foi revestido com 50µL de tampão carbonato/bicarbonato pH 9.6 contendo um total de 20ng de uma mistura de antígenos. Os ensaios foram realizados de acordo com a descrição do item 7.2.1.

Tabela 5: Combinações usadas para a realização dos imunoenaios

Combinações	Antígenos	Genótipo(s)
Combinação 1	2 + 3	1b
Combinação 2	2 + 3 + 4	1b
Combinação 3	2 + 3 + 4 + 5	1b
Combinação 4	1 + 2 + 3 + 4 + 5	1b, 3a
Controle	Proteínas Quiméricas (ProSpec e Fapon)	1

[00207] Os resultados obtidos com os ensaios em combinação de antígenos pelo formato ELISA foram plotados em um gráfico de dispersão usando o índice de reatividade conforme a Figura 5 e podem ser observados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Parâmetros gerados através das análises de desempenho dos antígenos por ensaios ELISA em combinação.

Ensaio ELISA em combinação (20ng)				
	Comb1	Comb2	Comb3	Comb4
Área da Curva ROC	0,9976	0,9983	0,9979	1,000
<i>Cut off</i>	0,163	0,135	0,11	0,129

Negativos	160	162	160	165
Negativos verdadeiros	165	165	165	165
Positivos	23	23	23	23
Positivos verdadeiros	23	23	23	23
Falso positivo	5	3	4	-
Sensibilidade (%)	100	100	96,88	100
Especificidade (%)	95,95	98,22	98,22	100
95% IC (%)	0,9941- 1,001	0,9956- 1,001	0,9955- 1,001	1-1
p value	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

[00208] Sensibilidade e especificidade foram obtidas pela análise da curva ROC, revelando que as combinações 1, 2 e 4 apresentaram sensibilidade máxima (100%). Dentre elas, a combinação 4 apresentou sensibilidade e especificidade de 100% com desempenhos superiores aos obtidos quando os antígenos foram avaliados individualmente no ensaio ELISA.

[00209] Além disto, os resultados obtidos concordam com os dados dos ensaios LUMINEX em formato *multiplex* dentre os quais, as maiores AUC foram obtidas pela combinação 4 que possui epítomos específicos para a os genótipos 1b e 3a.

7.3. Ensaio de Microarranjo Líquido

7.3.1. Acoplamento

[00210] Primeiramente, foram realizados ensaios de acoplamento dos antígenos purificados em pequena escala às microesferas a partir de 25, 50 e 100µg/mL em tampão PBS pH 7,4, MES pH 5.5 e Carbonato de Sódio 100mM pH 9.0 com o objetivo de avaliar o potencial das proteínas desenvolvidas frente às variáveis apresentadas.

[00211] Devido à presença dos agregados no momento da diluição, optou-se por trabalhar com concentrações inferiores a 25µg/mL e a realização do acoplamento em tampão contendo ureia, o que foi fundamental para conferir

estabilidade às proteínas.

[00212] Confirmado o potencial de uso destes antígenos, os ensaios foram realizados com os antígenos purificados obtidos pelo equipamento ÄKTA *purifier* cujas concentrações de acoplamento variaram entre 7.5 e 15µg/mL de proteínas.

[00213] Foi realizado o acoplamento das proteínas às microesferas na presença dos tampões: (1) 1M de ureia em PBS pH 7,4, (2) Tampão de estocagem contendo 4M de ureia, 20 mM Fosfato pH 7,5, 50mM NaCl, 7mM B-mercaptoetanol, (3) PBS pH 7,4 e (4) Carbonato de Sódio 100mM, pH 9,0. Estes ensaios foram realizados frente ao painel completo AEQ contendo os 188 soros.

[00214] Com relação ao Antígeno 1, foram acoplados na concentração de 15µg/mL. O acoplamento na presença de tampão contendo 4M de ureia não apresentou precipitação, também não houve diminuição na contagem do número de microesferas. Os parâmetros obtidos a partir da análise da curva ROC para as microesferas acopladas no tampão contendo 4M de ureia demonstraram uma performance superior quando comparados aos resultados obtidos com os acoplamentos em tampões contendo 1M de ureia, PBS ou Carbonato de sódio. Ensaio realizado com concentrações inferiores a 15µg/mL para não favorecer o desempenho dos ensaios para estas proteínas e houve perda de sensibilidade.

[00215] No acoplamento para os antígenos mais simples (Antígenos 2 e 3), o acoplamento em concentração inferior a 15µg/mL favoreceu o desempenho do ensaio e foi possível padronizar o acoplamento na concentração de 7,5µg/mL, na presença de tampão contendo 4M de ureia.

[00216] Nestas condições foram obtidos os melhores valores para as áreas de abaixo da curva ROC, 100% de sensibilidade e aumento na especificidade, além de maiores capacidades de separação entre as amostras negativas e positivas, observadas através dos valores do *signal to noise ratio*

(SNR).

[00217] Já a padronização para os antígenos 3 e 4 foi realizada em tampão PBS e carbonato de sódio a 15µg/mL, respectivamente (Figuras 4.16 e 4.17). Estes resultados forneceram ótimas informações a respeito dos antígenos desenvolvidos, uma vez que a produção em larga escala com aplicabilidade diagnóstica requerem ensaios que proporcionem maior performances como o aumento da probabilidade de positividade, a máxima sensibilidade e especificidade, além da utilização de baixas concentrações de antígenos, com o objetivo de diminuir custos.

[00218] Em resumo, as condições ótimas para realização dos acoplamentos para cada um dos antígenos são descritas na Tabela 7.

Tabela 7: Melhores parâmetros para o acoplamento dos antígenos às microesferas

Antígeno	Condição	Tampão de Acoplamento
1	15µg/mL	4M Ureia, 20mM fosfato, 50mM NaCl, pH 7,4
2	7µg/mL	4M Ureia, 20mM fosfato, 50mM NaCl, pH 7,4
3	7µg/mL	4M Ureia, 20mM fosfato, 50mM NaCl, pH 7,4
4	15µg/mL	100 mM Carbonato de sódio pH 9,0
5	15µg/mL	PBS pH 7,2

[00219] O acoplamento foi realizado diluindo-se os antígenos para o volume final de 100µL. Os antígenos foram diluídos e mantidos refrigerados até o momento do uso. Paralelamente, as microesferas foram homogeneizadas no frasco matriz com o auxílio de um agitador do tipo vórtex, seguida de um banho de ultrassom no Cole-Parmer (Vernon Hills-IL, EUA). O frasco matriz contendo a solução com as microesferas (12.500.000 microesferas/mL) foi agitado seguidamente no vórtex e no banho de ultrassom por 30 segundos por até três vezes. Na sequência, o volume de 80µl contendo 1.000.000

microesferas foi transferido para um poço da microplaca de 96 poços, fundo chato de baixa adesão. As microesferas foram lavadas 2 vezes na lavadora de placas Hydroflex (TECAN, Durham - NC) utilizando o programa MAGSOAK. Aos poços contendo as microesferas, foram adicionados 80µL de Tampão de Ativação (0,1M NaH₂PO₄, pH 6,2) seguida da adição de 10µL de soluções recém-preparadas de 50mg/mL Sulfo-NHS (*N-hydroxysulfosuccinimide*) e 50mg/mL EDC (*1-etil-3-[3 - dimetilaminopropil] carbodiimida*). Os poços foram homogeneizados com o auxílio de uma pipeta e a placa foi incubada a 25°C por 20 minutos, sob agitação (250rpm) ao abrigo da luz. Dado o período de incubação, a solução foi aspirada automaticamente selecionando o programa ASP da lavadora, seguida da adição de 100µL do Tampão de Acoplamento desejado com o objetivo de equilibrar o ambiente onde as microesferas se encontram para receber o antígeno previamente diluído. As placas foram seladas com um filme, revestidas em papel alumínio e incubadas à temperatura de 37°C por 2 horas, sob agitação (250rpm). Por fim, o programa MAGSOAK 2 foi acionado para a última lavagem utilizando 100µL de Tampão de Bloqueio PBS/TBN (Tampão PBS pH 7.2, 1% de albumina bovina, Tween 20 0,02%, NaN₃ 0,01%). As microesferas foram transferidas para um tubo do tipo *Eppendorf* de baixa aderência (*low-binding* - USA *Scientific*) e mantidas em Tampão de Bloqueio por um tempo mínimo de 24 h a 4°C por recomendação da *Luminex Corporation*.

7.3.2. Ensaios no Formato *Singleplex*

[00220] No formato *singleplex*, considerou-se que cada poço receberia 50µL de uma solução contendo 2.500 microesferas acopladas ao antígeno de interesse. O frasco matriz foi agitado por vórtex e banho ultrassom e o volume de trabalho foi transferido para um tubo do tipo Falcon de 15 ou 20mL contendo tampão PBS/TBN e 2% de uma solução de extrato de *E. coli* (10mg/mL). Os poços receberam as amostras sorológica previamente diluída 1:200 em tampão

PBS/TBN (Tampão PBS pH 7.2, 1 % de albumina bovina, Tween 20 0,02 %, NaN3 0,01%) e após a adição das microesferas, as placas de 96 poços foram incubadas por 20 minutos a 37°C a 250 rpm, seguida de lavagens com Tampão de Bloqueio PBS/TBN. A reação dos antígenos acoplados com os anticorpos específicos presentes no soro do paciente ocorreu através da interação de anticorpos IgG anti-HCV. As placas foram lavadas através do programa MAGSOAK O anticorpo secundário de cabra anti-IgG humano conjugado à ficoeritrina (R-PE) (Moss Inc., Pasadena-CA, EUA) foi diluído 1:1000 em tampão de bloqueio PBS/TBN e 50µL desta diluição foram adicionados aos poços. A placa foi novamente incubada por 20 minutos a 37°C sob proteção da luz e sob agitação (250rpm) seguida de uma sequência de lavagens onde, no final a lavadora desprezou 100 µL de um tampão chamado *SheathFluid* em cada poço. O *SheathFluid* é um tampão específico desenvolvido e comercializado pela *Luminex Corporation*. para uso na leitura das microesferas pela plataforma *xMAP 200*, adquirindo 100 eventos independentes por poço. Por fim, a placa foi levada para a leitura da reação por identificação dos códigos das microesferas e detecção da presença do anticorpo secundário. A análise dos resultados foi realizada considerando os sinais da Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) e do código da microesfera acoplada no equipamento Luminex 200® para avaliação de 100 eventos por poço.

[00221] As Figuras 6 a 10 mostram o desempenho individual dos Antígenos 1 a 5, respectivamente, apresentados na forma de gráfico através da normatização obtida pelo índice de reatividade (IR). A linha pontilhada representa o ponto de corte e a área sombreada representa a zona cinza (*cut off* ± 10%). A análise dos resultados foi realizada considerando os sinais medianos da imunofluorescência (MFI) e intervalo de confiança a 95%.

[00222] Nas Figuras 6 a 10, é possível verificar o desempenho das proteínas em diferentes condições de acoplamento e os dados referentes às

análises estatísticas a partir da curva ROC para diferentes condições de acoplamento dos Antígenos 1 a 5 são apresentados nas Tabelas 8-12.

Tabela 8: Parâmetros obtidos a partir do desempenho do Antígeno 1 para avaliação das melhores condições de acoplamento

Antígeno 1 (clone 4.7) - 15µg/mL				
	1 M Ureia pH 7,4	4 M Ureia pH 7,5	PBS pH 7,4	Carbo pH 9,0
Área da Curva ROC	0,9813	0,9971	0,9639	0,788
<i>Cut off</i>	117,3	361,5	104,5	44,63
Negativos	162	155	142	131
Negativos verdadeiros	165	165	165	165
Positivos	20	23	2	16
Positivos verdadeiros	23	23	23	23
Falso positivo	3	10	23	34
Sensibilidade (100%)	86,96	100	95,65	69,57
Especificidade (100%)	98,18	94,55	83,64	77,58
95% IC (%)	0,9573-1,005	0,9918-1,002	0,9337-0,9941	0,6951-0,8809
<i>p</i> value	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Tabela 9: Parâmetros obtidos a partir do desempenho do Antígeno 2 para avaliação das melhores condições de acoplamento

Antígeno 2 (clone 4.11) – 7,5µg/mL e 15µg/mL					
		1M Ureia pH 7,4	4M Ureia pH 7.5	PBS pH 7,4	Carbo pH 9,0
7,5 µg/mL	Área da Curva ROC	0,9752	0,9971	0,9669	0,9665
15 µg/mL		0,9391	0,9971	-	-
7,5 µg/mL	<i>Cut off</i>	400	442	500	520,5
15 µg/mL		1000	200	-	-

7,5 µg/mL 15 µg/mL	Negativos	163 157	163 164	163 -	160 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	Negativos verdadeiros	165 165	165 165	165 -	165 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	Positivos	22 19	21 22	20 -	22 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	Positivos verdadeiros	23 23	23 23	23 -	23 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	Falso positivo	2 8	2 1	6 -	5 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	Sensibilidade (100%)	95,65 82,61	95,65 95,65	86,96 -	95,15 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	Especificidade (100%)	97,58 95,15	99,39 99,39	96,36	91,03 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	95% IC (%)	0,9311- 1,019 0,8735- 1,005	0,9939- 0,9971 0,9965- 1,002	0,9636- 0,9971 -	0,9123- 1,021 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	<i>p</i> value	< 0,001 < 0,001	< 0,001 < 0,001	< 0,001 -	< 0,001 -

Tabela 10: Parâmetros obtidos a partir do desempenho do Antígeno 3 para avaliação das melhores condições de acoplamento

Antígeno 3 (clone 4.12) – 7,5µg/mL e 15µg/mL					
		1 M Ureia pH 7.4	4 M Ureia pH 7.5	PBS pH 7,4	Carbo pH 9,0
7,5 µg/mL 15 µg/mL	Área da Curva ROC	1,000 -	1,000 1,000	0,9995 0,9984	0,9997 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	<i>Cut off</i>	211 -	572,3 500	186,1 413	399 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	Negativos	164 -	165 165	163 164	164 -
7,5 µg/mL 15 µg/mL	Negativos verdadeiros	165 -	165 165	165 163	165 -

7,5 µg/mL	Positivos	23	23	23	22
15 µg/mL		-	23	22	-
7,5 µg/mL	Positivos verdadeiros	23	23	23	23
15 µg/mL		-	23	23	-
7,5 µg/mL	Falso positivo	1	-	-	1
15 µg/mL		-	-	1	-
7,5 µg/mL	Sensibilidade (100%)	100	100	100	100
15 µg/mL		-	100	95,65	-
7,5 µg/mL	Especificidade (100%)	95,65	100	100	99,39
15 µg/mL		-	100	98,79	-
7,5 µg/mL	95% IC (%)	1-1	1-1	1-1	0,9989-
15 µg/mL		-	1-1	0,9954-	1,001
7,5 µg/mL	<i>p</i> value	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
15 µg/mL		-	< 0,001	< 0,001	-

Tabela 11: Parâmetros obtidos a partir do desempenho do Antígeno 4 para avaliação das melhores condições de acoplamento

Antígeno 4 (clone 4.13) – 7,5 µg/mL e 15 µg/mL					
		1 M Ureia pH 7.4	4 M Ureia pH 7.5	PBS pH 7,4	Carbo pH 9,0
7,5 µg/mL	Área da Curva ROC	0,992	0,9995	1,000	1,000
15 µg/mL		-	-	0,996	0,9886
7,5 µg/mL	<i>Cut off</i>	138	299	130,8	154,9
15 µg/mL		-	-	184,5	76
7,5 µg/mL	Negativos	163	164	165	165
15 µg/mL		-	-	156	165
7,5 µg/mL	Negativos verdadeiros	165	165	165	165
15 µg/mL		-	165	165	-
7,5 µg/mL	Positivos	21	23	23	23
15 µg/mL		-	-	22	21
7,5 µg/mL	Positivos verdadeiros	23	23	23	23
15 µg/mL		-	23	23	-

7,5 µg/mL	Falso positivo	3	1	-	-
15 µg/mL		-	-	9	-
7,5 µg/mL	Sensibilidade (100%)	95,65	100	100	100
15 µg/mL		-	-	100	95,83
7,5 µg/mL	Especificidade (100%)	97,58	99,39	100	100
15 µg/mL		-	-	93,90	96,96
7,5 µg/mL	95% IC (%)	0,9803-1,005	0,9980-1,001	1-1 0,9905-	1-1
15 µg/mL		-	-	1.002	1-1
7,5 µg/mL	<i>p</i> value	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
15 µg/mL		-	-	< 0,001	< 0,001

Tabela 12: Parâmetros obtidos a partir do desempenho do Antígeno 5 para avaliação das melhores condições de acoplamento

Antígeno 5 (clone 4.14) – 7,5µg/mL e 15µg/mL					
		1 M Ureia pH 7.4	4 M Ureia pH 7.5	PBS pH 7,4	Carbo pH 9,0
7,5 µg/mL	Área da Curva ROC	0,9987	0,9995	0,9997	0,9913
15 µg/mL		-	-	0,9976	0,9995
7,5 µg/mL	<i>Cut off</i>	297	309,8	436,9	288
15 µg/mL		-	-	196	296,5
7,5 µg/mL	Negativos	164	163	164	165
15 µg/mL		-	163	164	-
7,5 µg/mL	Negativos verdadeiros	165	165	165	165
15 µg/mL		-	165	165	-
7,5 µg/mL	Positivos	22	22	23	22
15 µg/mL		-	23	22	-
7,5 µg/mL	Positivos verdadeiros	23	23	23	23
15 µg/mL		-	23	23	-
7,5 µg/mL	Falso positivo	1	2	1	-
15 µg/mL		-	-	1	-
7,5 µg/mL	Sensibilidade (100%)	100	100	100	86,65
15 µg/mL		-	100	95,65	-
7,5 µg/mL	Especificidade (100%)	95,76	98,18	99,39	100
15 µg/mL		-	91,56	98,79	-
7,5 µg/mL	95% IC (%)	0,9961-1,001	0,9980-1,001	0,9989-1,001	0,9784-
15 µg/mL		-	0,998-1,001	0,9933-1,002	1,004

7,5 µg/mL	<i>p</i> value	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
15 µg/mL		-	< 0,001	< 0,001	-

7.3.3. Ensaios no Formato *Multiplex*

[00223] Em vista das condições de acoplamento e concentração de antígenos padronizadas pelos ensaios *singleplex* no LUMINEX, os antígenos foram acoplados individualmente a um código diferente de microesfera que foram utilizados no mesmo poço, ao mesmo tempo, para testar um único soro. Os ensaios foram realizados segundo o protocolo descrito acima, onde cada poço recebeu 2.500 microesferas/código. A identificação dos códigos das microesferas e a presença da fluorescência do anticorpo secundário conjugado a ficoeritrina foi realizada no equipamento LUMINEX.

[00224] Os ensaios no formato *multiplex* aplicaram as mesmas combinações identificadas na Tabela 3.

[00225] Nos ensaios multiplexados, as análises individuais dos antígenos apresentaram real perda de sensibilidade em todos os experimentos. Estes resultados foram esperados, uma vez que o ensaio *multiplex* trabalha com a adição de um número maior de antígenos (2.500/código) dentro de um único poço onde haviam os mesmos números de anticorpos competindo por sítios semelhantes.

[00226] Através do índice de reatividade e dos dados obtidos a partir dos valores gerados pela curva ROC foi observado que as combinações 1, 3, e 4 apresentaram 100% de sensibilidade (Tabela 13 e Figura 11). A Figura 11 mostra *Scatter plot* para o IR dos soros para diferentes condições de acoplamento. A linha pontilhada representa o ponto de corte e a área sombreada representa a zona cinza (*cut off* ± 10%). A análise dos resultados foi realizada considerando os sinais medianos da imunofluorescência (MFI) e intervalo de confiança a 95%. Os dados da análise do controle foram obtidos a partir do ensaio *singleplex* utilizando a proteína comercial quimérica ProSpec #HCV-207.

[00227] Dentre eles, os conjuntos de antígenos para as combinações 1 e 4 apresentaram 100% de sensibilidade e de especificidade. Entretanto, a combinação 4 foi a que, claramente, apresentou a maior capacidade discriminatória entre os soros, com a maior distância entre as MFIs para os soros negativos e positivos. Para esta combinação, o IR foi de até 140 vezes maior que o IR obtido para os soros negativos. Este ensaio demonstrou também, o menor desvio padrão para os soros negativos.

Tabela 13: Análise dos ensaios no formato *multiplex* via LUMINEX

Ensaio LUMINEX em formato <i>multiplex</i>				
	Comb1	Comb2	Comb3	Comb4
Área da Curva ROC	1,000	0,998	0,9991	1,000
<i>Cut off</i>	410	200	150	50
Negativos	165	165	164	165
Negativos verdadeiros	165	165	165	165
Positivos	23	22	23	23
Positivos verdadeiros	23	23	23	23
Falso positivo	-	1	-	-
Sensibilidade (%)	100	99,36	100	100
Especificidade (%)	100	100	99.36	100
95% IC (%)	1-1	0,9786-1,000	0,997-1,001	1-1
<i>p value</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

EXEMPLO 8: Análise da Relação Sinal Ruído (SNR)

[00228] Na avaliação do desempenho individual através da relação sinal/ruído (SNR) para os antígenos no ensaio ELISA simples, foi demonstrado que os maiores valores foram apresentados pelo Antígeno 3, com 23,6 vezes a capacidade de separação dos soros positivos e negativos (Figura 12).

[00229] No ensaio LUMINEX *singleplex*, as relações sinal/ruído ou

SNR demonstraram baixas performances para o Antígeno 1, com probabilidade de positividade de 21,5. Estes valores foram superiores ao valor apresentado para a proteína comercial ProSpec #HCV-207, cuja probabilidade de positividade foi de 13 (Figura 13). A média dos sinais para os soros concordam com os valores apresentados.

[00230] Para os demais antígenos, a probabilidade de positividade ou a capacidade de separação entre os soros foi superior ao valor obtido para o antígeno comercial. Dentre eles, os maiores valores alcançados foram para os ensaios realizados com o Antígeno 4, que apresentou SNR de 652,5, respectivamente (Figura 13).

[00231] Enquanto a capacidade de separação para o Antígeno 1 no formato simples por ELISA foi a segunda mais baixa dentre os antígenos testados, no formato combinado por ELISA este antígeno foi fundamental para aumentar o desempenho e a probabilidade de positividade para a combinação 4 (Figura 14).

[00232] A Figura 15 mostra o gráfico de barras onde a combinação 4 apresenta a maior capacidade de separação dentre a média dos sinais para as amostras positivas e negativas, cuja probabilidade de positividade para esta combinação foi de 1.053,7 vezes. De longe, este foi o melhor desempenho alcançado na presente invenção. Além disto, capacidades de separação para as demais combinações no ensaio *multiplex* foram altas quando comparada à performance do antígeno controle.

EXEMPLO

REFERÊNCIAS

ARAUJO, A. C., ASTRAKHANTSEVA, I. V., FIELDS, H. A., KAMILI, S. Distinguishing Acute from Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Infection Based on Antibody Reactivities to Specific HCV Structural and Non-structural Proteins. **Journal of Clinical and Microbiology**. v. 49 (1), p.54-57. 2011. Doi: 10.1128/JCM.01064-10.

BRAND, H. E. **Desenvolvimento de teste diagnóstico para triagem sorológica de diversas infecções virais.** Doutorado em Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brasil, 2014.

CHATEL-CHAIX L., MELANCON P., RACINE M. E. Y-box-binding protein 1 interacts with hepatitis C virus NS3/4A and influences the equilibrium between viral RNA replication and infectious particle production. **Journal of Virology**, v. 85, p. 11022-37, 2011.

CHEN, S. L., MORGAN, T. R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. **International Journal of Medicine and Sciences**. v. 3 (2), p. 47-52. 2006.

CLOHERTY, G., TALAL, A., COLLER, K., STEINHART, C., HACKETT, J. Role of Serologic and Molecular Diagnostic Assays in Identification and Management of Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 54 (2), p. 265–273, 2016.

de VICENTE J., HENDRICKS, R. T., SMITH DB, *et al.* Non-nucleoside inhibitors of HCV polymerase NS5B. Part 2: synthesis and structure–activity relationships of benzothiazinesubstituted quinolinediones. **Bioorganic and amp. Med Chemistry Letters**, v. 19, p. 3642-3846, 2009.

DIPTI, C. A., JAIN, S. K., NAVIN, K. A novel recombinant multi epitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. **Protein Expression and Purification**, v. 47(1), p. 319–328, 2006.

FONSECA, B. P. F., MARQUES, C. F. S., NASCIMENTO, L. D., MELLO, M. B., SILVA, L. R.B., RUBIM, N. M., FOTI, L., SILVA, E. D., FERREIRA, E. G.P., KRIEGER, M. A. Development of a Multiplex Bead Based Assay for Detection of Hepatitis C Virus. **Clinical and Vaccine Immunology**, v 18 (5), p. 802-806, 2011. Doi:10.1128/CVI.00265-10.

FREEDMAN, H., LOGAN, M. R., LAW, J. L. M., HOUGHTON, M. Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. University of Alberta, **ACS Infectious Disease**. 2016. Doi: 10.1021/acsinfecdis.6b00110.

GALDINO, A. S., SANTOS, J. C., SOUZA, M. Q., NÓBREGA, Y. K. M., XAVIER, M. E., FELIPE, M S. S. FREITAS, S. M., TORRES, F. A. G. A Novel Structurally Stable Multiepitope Protein for Detection of HCV. **Hepatitis Research and Treatment**. 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6592143>.

GUPTA, E., BAJPAI, M., CHOUDHARY, A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assay. **Asian Journal of Transfusion**. Sci. v. 8(1), p. 19–25, 2014.

HANAFIAH, K. M., GROEGER, J., FLAXMAN, A. D., WIERSMA, S. T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology Viral Hepatitis**. V. 57 (4), p. 1333–1342, 4 February 2013. Doi: 10.1002/hep.26141.

HEPATITIS C MORTALITY. Hepatitis C Kills More Americans than Any Other Infectious Disease. **CDC 24/7**. May 4, 2016.

HUANG, Z-S., WANG, C-C., WU, H-N. HCV NS3 protein helicase domain assists RNA structure conversion. **FEBS Letters**, v. 584, p. 2356-62, 2010.

KAMILI, S., DROBENIUC, J., ARAUJO, A. C., HAYDEN, T. M. Laboratory Diagnostics for Hepatitis C virus infection. **Clinical Infectious Diseases**. v.55 (S1), p. 43-8, 2012.

KEYVANI, H., FAZLALIPOUR, M., MONAVARI, S. H. R., MOLLAIE, H. R. Hepatitis C Virus - Proteins, Diagnosis, Treatment and New Approaches for Vaccine Development. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.13, p. 5917-5935, 2012.

KHUROO, M. S, KHUROO, N. S., KHUROO, M. S. Accuracy of Rapid Point-of-Care Diagnostic Tests for Hepatitis B Surface Antigen-A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**. v. 4 (3), p. 226–240, 2014.

KIM, J. L., MORGENSTERN, K. A., LIN, C., FOX, T., DWYER, M. D., LANDRO, J. A., CHAMBERS, S. P., MARKLAND, W., LEPRE, C. A., O'MALLEY, E. T., HARBESON, S. L., RICE, C. M., MURCKO, M. A., CARON, P. R. AND THOMSON, J. A. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. **Cell**. v. 87, p. 343. 1996.

KIM, H., MAZUMDAR, B., BOSE, S. K., *et al.* Hepatitis C Virus Mediated Inhibition of Cathepsin S Increases Invariant Chain Expression on Hepatocyte Cell Surface. **Journal of Virology**, v. 36, p. 56-9. 2012.

LIN, C., LINDENBACH, B. D., PRAGAL, B. M., MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. Processing in the hepatitis C virus E2–NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. **Journal of Virology**. v. 68 (8), p. 5063–5073, 1994.

LIN, H. J., LAU, J. Y., LAUDER, I. J., SHI, N., LAI, C. L., HOLLINGER, F. B. The hepatitis C virus genome: a guide to its conserved sequences and candidate epitopes. **Virus Res.** v. 30, p. 27–41, 1993.

MASSARIOL, M-J., ZHAO, S., MARQUIS, M., THIBEAULT, D., White, P. W. Protease and helicase activities of hepatitis C virus genotype 4, 5, and 6 NS3–NS4A proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v.391, p. 692-697, 2010.

McLAUHLAN, J., LEMBERG, M. K., HOPE, G., MARTOGLIO, B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. **EMBO Journal.** v. 21, p. 3980-8, 2002.

MELLO, C. E. B. Tratamento da hepatite crônica pelo vírus C novas perspectivas. **JBM Hepatologia**, Rio de Janeiro v. 102 (01), p. 23-32, 2014.

MESSINA, J. P.; HUMPHREYS, I.; FLAXMAN, A.; BROWN, A.; COOKE, G. S.; PYBUS, O. G.; BARNES, E. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology.** 61(1), p. 77–87, 2015.

OLIVEIRA, C. P. Caracterização molecular do vírus da Hepatite C em indivíduos coinfectados com HIV-1. Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Departamento De Biologia Celular Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular. Tese de doutorado, Brasília, 2007.

PIVER, E.; ROINGEARD, P., PAGÈS, J-C. The cell biology of hepatitis C virus (HCV) lipid addiction: Molecular mechanisms and its potential importance in the clinic. **International Journal Biochemistry and amp; Cell Biology**, v. 42, p. 869-79, 2010.

POPESCU, C-I., CALLENS, N., TRINEL, D., ROINGEARD, P., MORADPOUR, D., DESCAMPS, V., DUVERLIE, G., PENIN, F., HELIOT, L., ROUILLE, Y., Dubuisso, J. NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. **PLoS Pathogens**, 7(2), e1001278. 2011. Doi: 10.1371/journal.ppat.

PRATT, J. K., DONNER, P., MCDANIEL, K. F. *et al.* Inhibitors of HCV NS5B polymerase: synthesis and structure–activity relationships of N-1-heteroalkyl-4-hydroxyquinolon-3-ylbenzothiadiazines. **Bioorganic and amp; Med Chemistry Letters**, v. 15, p. 1577-82, 2005.

ROSA, D., SALETTI, G., DE GREGORIO, E, *et al.* Activation of naive B lymphocytes via cd81 a pathogenetic mechanism for hepatitis c virus-associated b lymphocyte disorders. **Proc Natl Acad Sci.** v.102, p. 18544-18549, 2005.

SALUDES, V., GONZALEZ, V., PLANAS, R., MATAS, L., AUSINA, V., MARTRÓ, E. Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging. **World Journal of Gastroenterology**. v. 20, p. 3431-3442, 2014. Doi: 10.3748/wjg.v20.i13.3431.

SHEPARD, C. W., FINELLI, L., ALTER, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infectious of Diseases**. v. 5, p. 558-67, 2005.

SHIVKUMAR, S., PEELING, R., JAFARI, Y., JOSEPH, L., PANT, P. N. Accuracy of rapid and point-of-care screening tests for hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. **Annals Internal Medicine**. v.157, p. 558–66. 2012.

SIMMONDS P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. **Journal of General Virology**. v. 85, p. 3173–3188, 2004.

SIMMONDS, P., Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. **Journal of General Virology**, v.74, p.661-8. 1993.

VITAL SIGNS: evaluation of hepatitis C virus infection testing and reporting. **MMWR**, U.S. sites, CDC. V. 62 (18), 2013.

YAMANAKA, T, KODAMA, T, AND DOI, T. Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. **Biochemistry Biophys. Res. Community**. v. 294 (3), p. 528-534. 2002.

ZENG, J., WU, Y., LIAO, Q., LI, L., CHEN, X., LIVER, X. receptors agonists impede hepatitis C virus infection in an Idol-dependent manner. **Antiviral Research**, v. 85, p. 36-9, 2012.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos duas regiões antigênicas do vírus da hepatite C (HCV) selecionadas a partir do grupo de região do nucleocapsídeo (NC) e regiões não estruturais NS3, NS4 e NS5.

2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender a sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9.

3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de consistir na sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9.

4. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para uso na triagem imunológica de Vírus da Hepatite C (HCV).

5. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica o polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por compreender a sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 e 10 e suas degenerações.

7. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo como definido na reivindicação 5 ou 6 operacionalmente ligado a um promotor e a um terminador de transcrição.

8. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo como definido na reivindicação 5 ou 6 ou um cassete de expressão como definido na reivindicação 7.

9. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de compreender um cassete de expressão como definido na reivindicação 7 ou um vetor de expressão como definido na reivindicação 8.

10. Método para produzir um polipeptídeo, caracterizado pelo

fato de que compreende:

- (a) transformar uma célula hospedeira com o polinucleotídeo como definido na reivindicação 5 ou 6,
- (b) cultivar dita célula para a produção do polipeptídeo;
- (c) isolar dito polipeptídeo de dita célula ou do meio de cultura circundando dita célula.

11. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou uma combinação de dois ou mais polipeptídeos como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de ser utilizada na triagem imunológica de HCV.

13. Kit para triagem imunológica de HCV ou diagnóstico de hepatite C, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou uma composição como definida na reivindicação 11 ou 12.

14. Kit de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de compreender ainda um meio de detecção para detectar o complexo antígeno-anticorpo.

15. Kit de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de compreender ainda um controle de reação.

16. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, caracterizado pelo fato de ser desenvolvido para ensaios do tipo indireto.

17. Uso de pelo menos um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, da composição como definida na reivindicação 11 ou 12 ou do kit como definido em qualquer uma das reivindicações 13 a 16, caracterizado pelo fato de ser para triagem imunológica de HCV ou para diagnóstico de hepatite C.

18. Método para triagem imunológica do HCV, caracterizado

pelo fato de compreender as etapas de:

(a) prover um ou mais polipeptídeos como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou uma composição como definida na reivindicação 11 ou 12;

(b) contatar os ditos um ou mais peptídeos ou a dita composição com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/antígeno; e

(c) detectar o complexo antígeno/anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/anticorpo.

19. Método para diagnóstico de hepatite C, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

(a) prover um ou mais polipeptídeos como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou uma composição como definida na reivindicação 11 ou 12;

(b) contatar os ditos um ou mais peptídeos ou a dita composição com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/antígeno; e

(c) detectar o complexo antígeno/anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/anticorpo.

20. Uso ou métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, caracterizado pelo fato de ser um imunoenensaio do tipo ELISA ou LUMINEX.

21. Uso ou métodos de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de o imunoenensaio ser em formato *singleplex* ou *multiplex*.

22. Uso ou métodos de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de o ensaio em formato *multiplex* compreender o uso

combinado de pelo menos dois dos polipeptídeos de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 e 9.

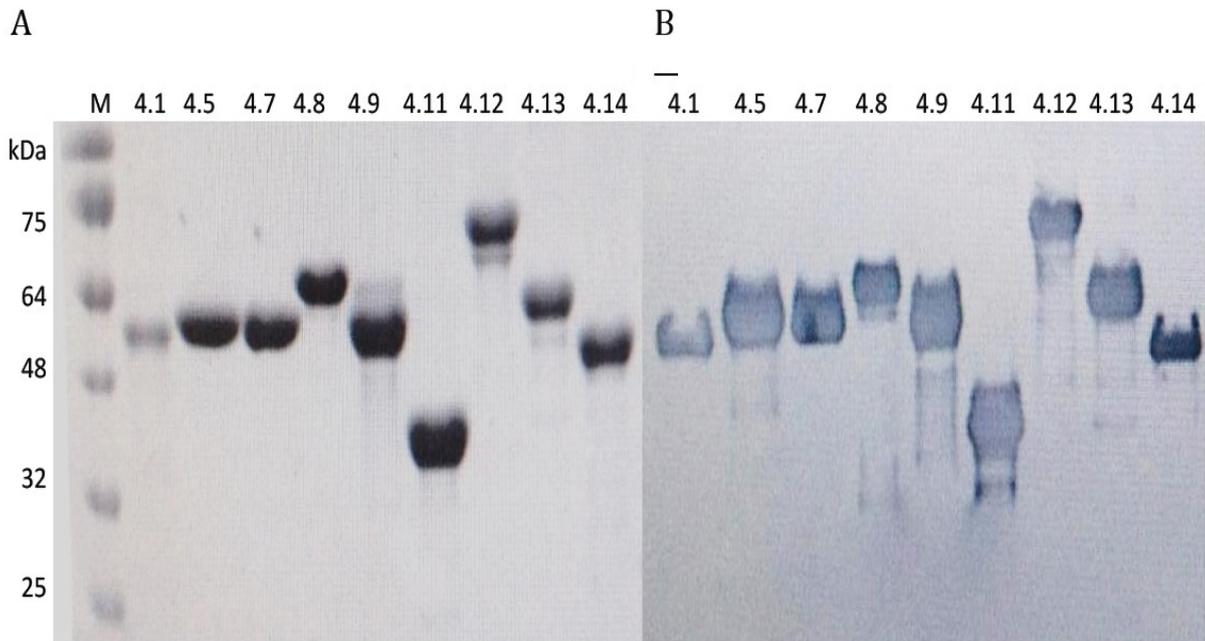


FIGURA 1

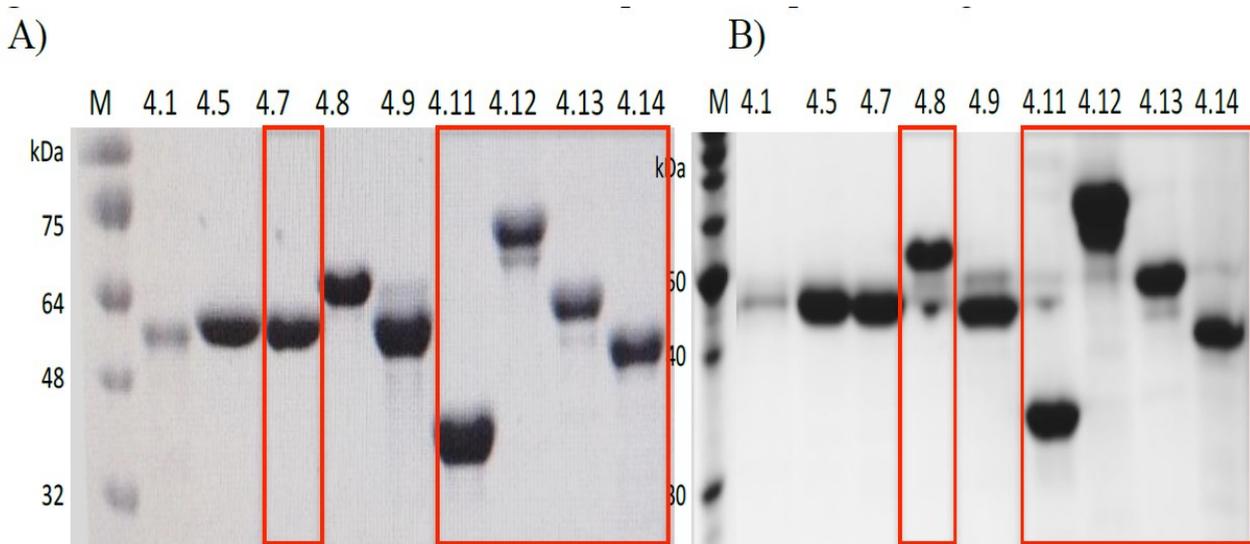


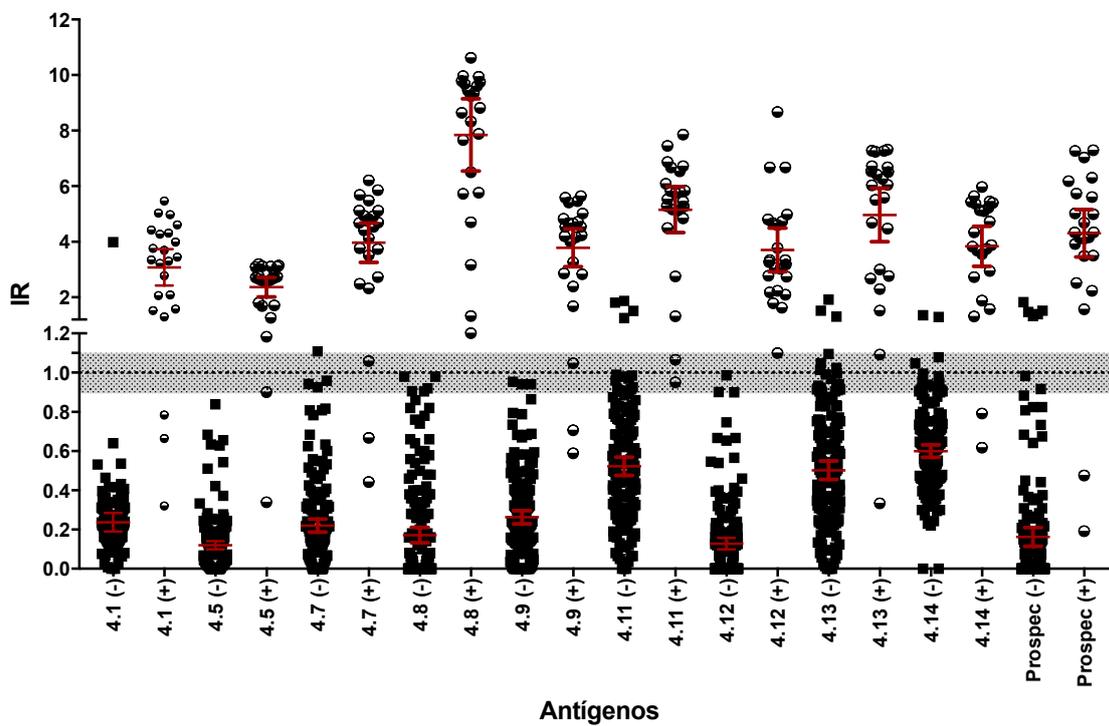
FIGURA 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BKG	HCV/HBV 6b6	HCV 11b6	HCV 22b3	HTLV 8a3	HIV 12d3	HIV 16a4	HTLV 5a6	HTLV 10a3	HTLV 14a6	HTLV 24a4	Sífilis 6c3
B	BKG	HCV/HBV 7b4	HCV 13b4	HIV 4a5	8a6	13a2	HTLV 18a1	HTLV 6a2	HTLV 10a4	HTLV 15a1	Sífilis 4c2	Sífilis 6c5
C	HCV/HBV 4b1	HCV 8b5	HCV 12a1	HIV 5a1	9a2	13a5	HIV 18a6	HTLV 6a6	HTLV 14a2	HTLV 15a6	Sífilis 4c3	Sífilis 7c3
D	HCV/HBV 4b2	HCV/HBV 8b6	HCV 15b1	HIV 5a2	9a3	14a4	HIV 19a1	HTLV 7a2	HTLV 11a6	HTLV 16a1	Sífilis 4c4	Sífilis 7c5
E	HCV/HBV 4b5	HCV 9b1	HCV 15b3	HIV 6a1	10a1	14a5	HIV 22a1	HTLV 7a5	HTLV 12d5	HTLV 16a2	Sífilis 4c6	Sífilis 7c6
F	HCV/HBV 5b1	HCV 10b2	HCV 15b4	HIV 7a1	10a2	15a3	HTLV 4a3	HTLV 8a5	HTLV 12d6	HTLV 11a2	Sífilis 5c1	Sífilis 8c1
G	HCV 5b2	HCV 10b3	HCV 16b2	HIV 7a4	11a1	15a5	HTLV 4a4	HTLV 9a1	HTLV 13a1	HTLV 22a2	Sífilis 5c2	Sífilis 8c2
H	HCV 6b5	HCV 11b2	HCV 20b1	HIV 8a1	11a4	16a3	HIV 5a5	HTLV 9a6	HTLV 13a3	HTLV 22a3	Sífilis 5c5	Sífilis 8c3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BKG	Sífilis 11c5	Sífilis 20c5	Chagas 9a4	Chagas 15a4	Chagas 9a5	HBV 8b4	HBV 13b1	HBV 18b5	HBV 22b4	NEG 15b2	NEG 19a6
B	BKG	Sífilis 11c6	Chagas 4a2	Chagas 10a5	Chagas 16a5	Chagas 12d1	HBV 9b3	HBV 13b2	HBV 18b6	HBV 4b3	NEG 17b5	NEG 20a3
C	Sífilis 8c6	Sífilis 16c1	Chagas 5a3	Chagas 10a6	Chagas 16a6	Chagas 12d2	HBV 9b4	HBV 13b5	HBV 19b1	HBV 5b4	NEG 18a6	NEG 20a6
D	Sífilis 9c2	Sífilis 17c4	Chagas 5a4	Chagas 11a3	Chagas 22a4	Chagas 13a4	HBV 5b6	HBV 14b3	HBV 19b2	NEG 5c3	NEG 18a3	NEG 20c1
E	Sífilis 10c4	Sífilis 17c5	Chagas 6a4	Chagas 11a5	Chagas 19a5	Chagas 20a5	HBV 10b1	HBV 14b6	HBV 19b3	NEG 13c2	NEG 18a4	NEG 20c2
F	Sífilis 10c5	Sífilis 18c2	Chagas 6a5	Chagas 13a6	Chagas 25a3	HBV 7b2	HBV 10b5	HBV 15b5	HBV 20b2	NEG 13c4	NEG 18a5	NEG 20c4
G	Sífilis 10c6	Sífilis 19c5	Chagas 7a6	Chagas 14a3	Chagas 4a1	HBV 7b6	HBV 11b1	HBV 15b6	HBV 20b3	NEG 13c6	NEG 19a3	NEG 20b5
H	Sífilis 11c2	Sífilis 20c3	Chagas 8a4	Chagas 15a2	Chagas 7a3	HBV 8b3	HBV 11b5	HBV 18b4	HBV 22b1	NEG 14b4	NEG 19a4	NEG 20b4

Positiva também para HBsAg

FIGURA 3



Antígenos

FIGURA 4

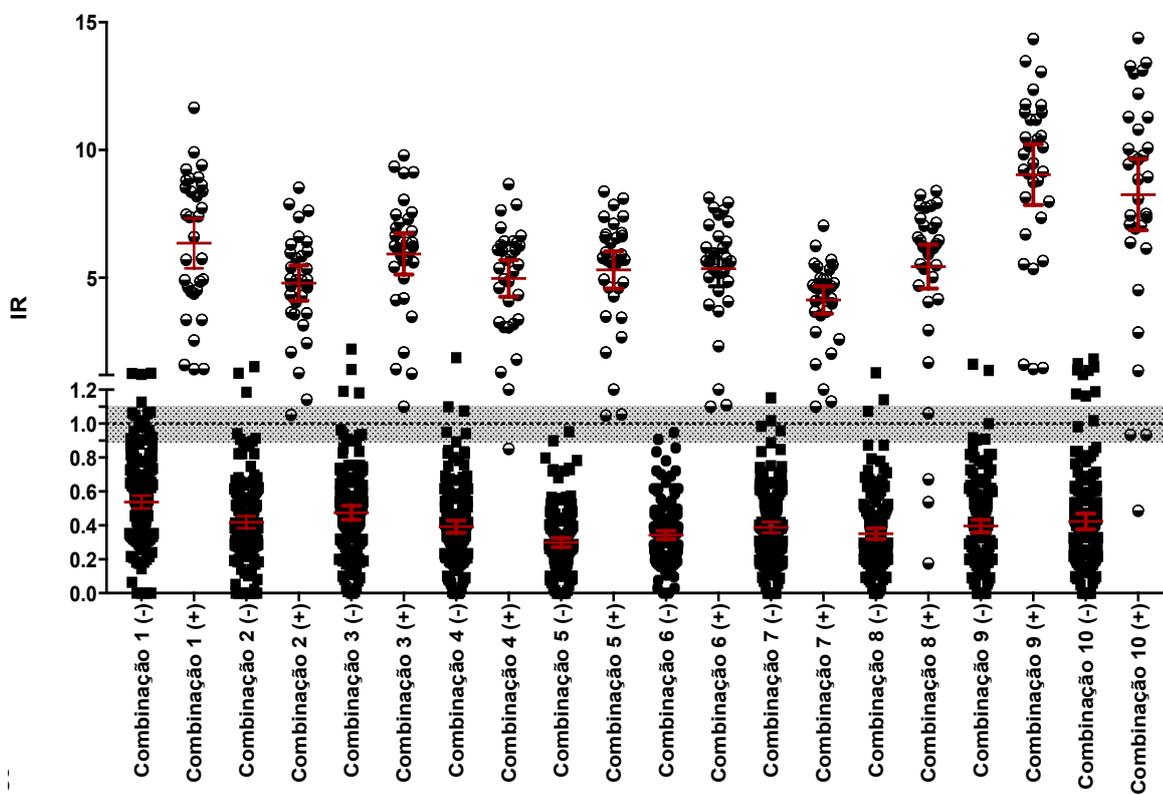


FIGURA 5

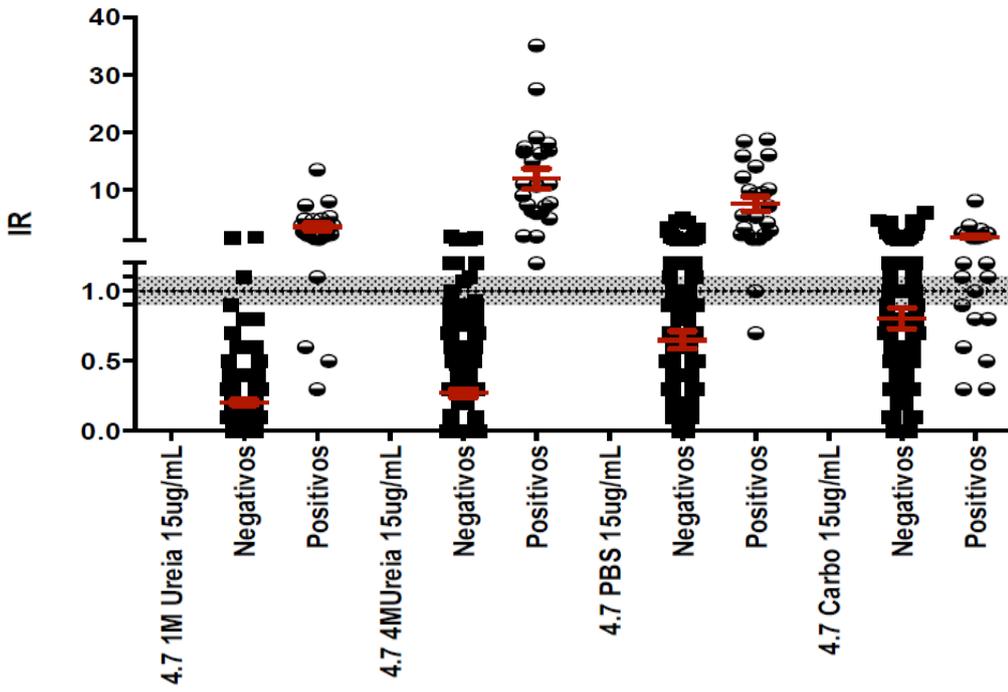


FIGURA 6

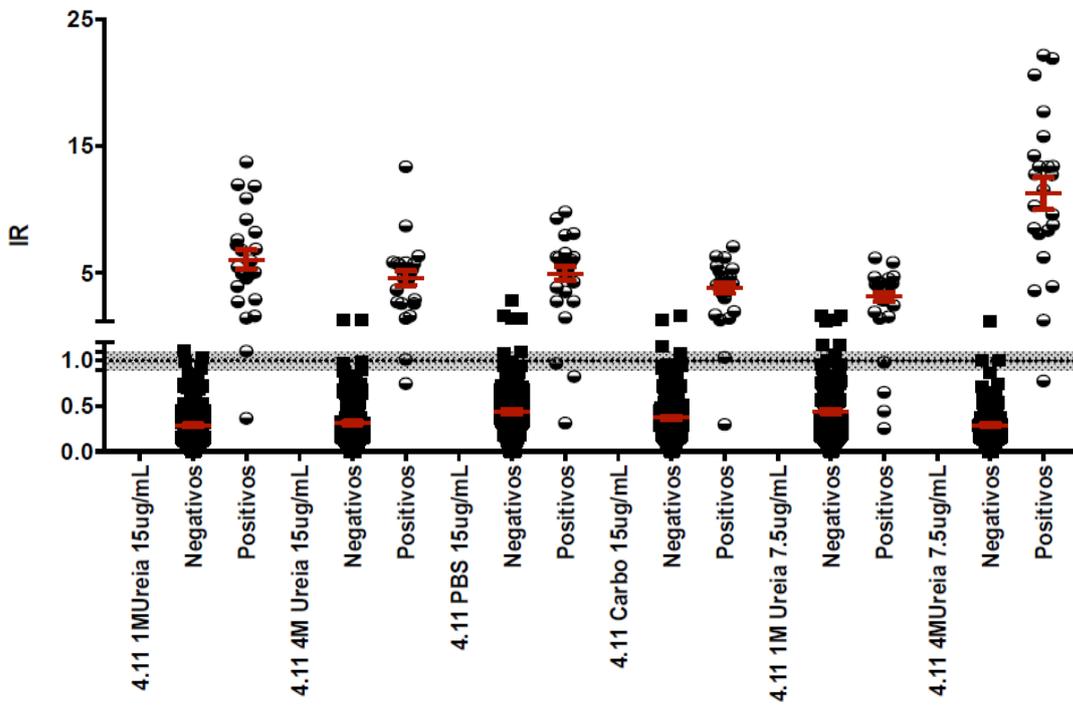


FIGURA 7

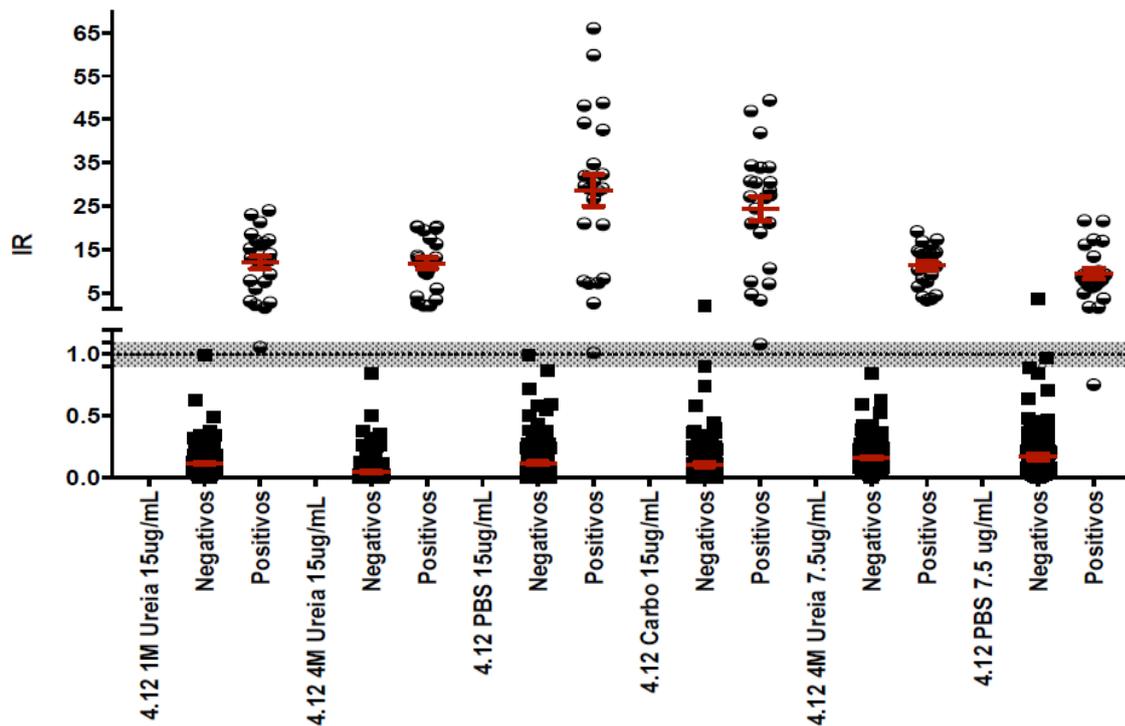


FIGURA 8

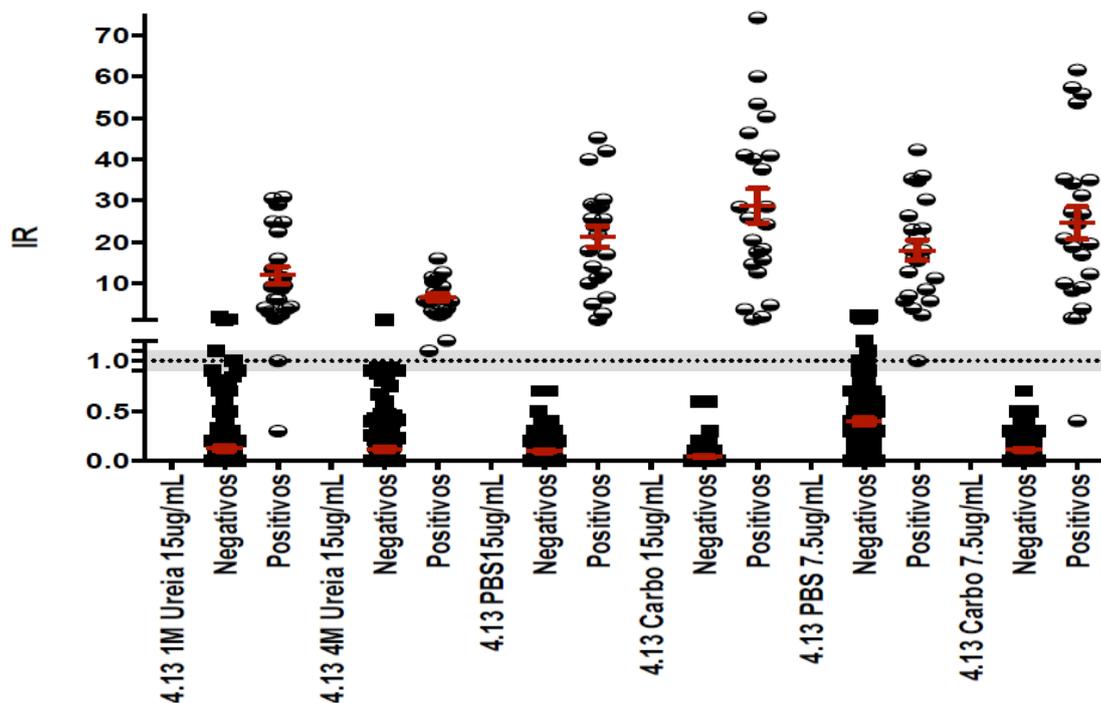


FIGURA 9

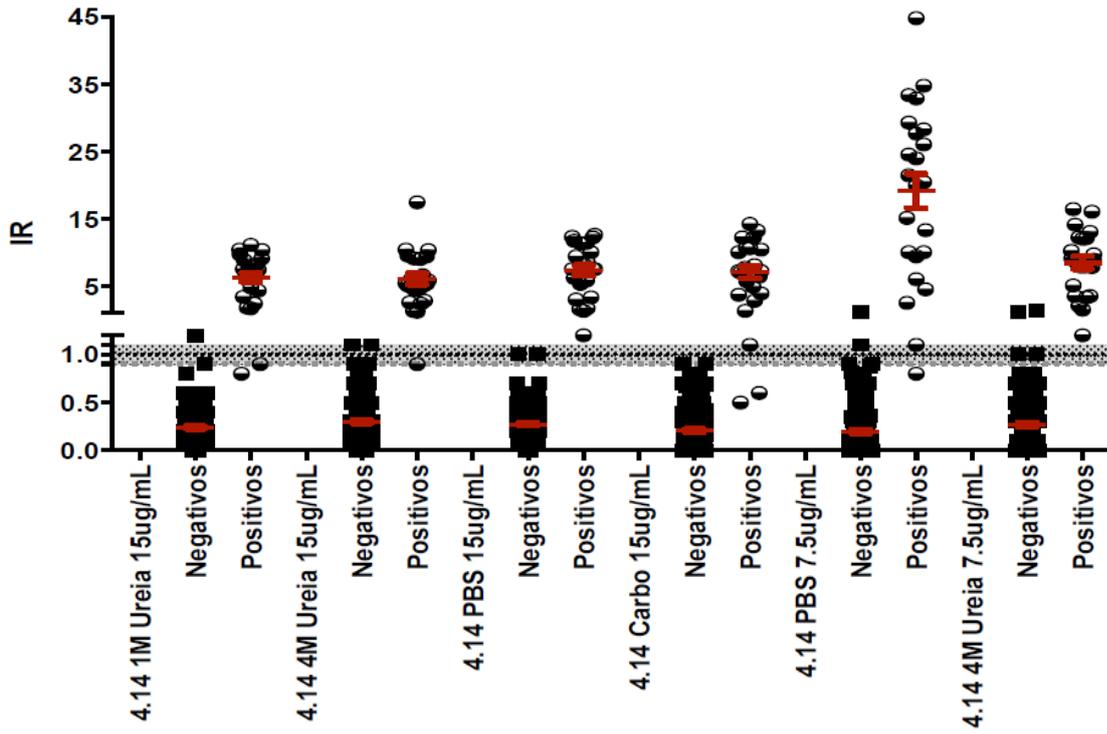


FIGURA 10

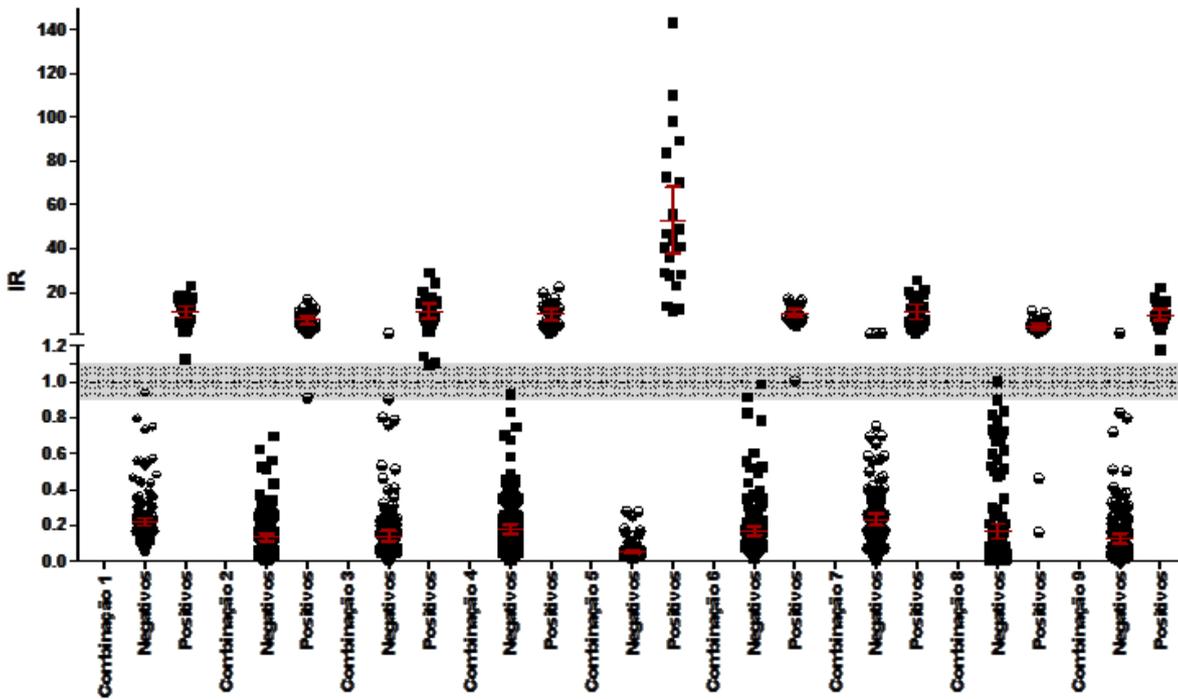


FIGURA 11

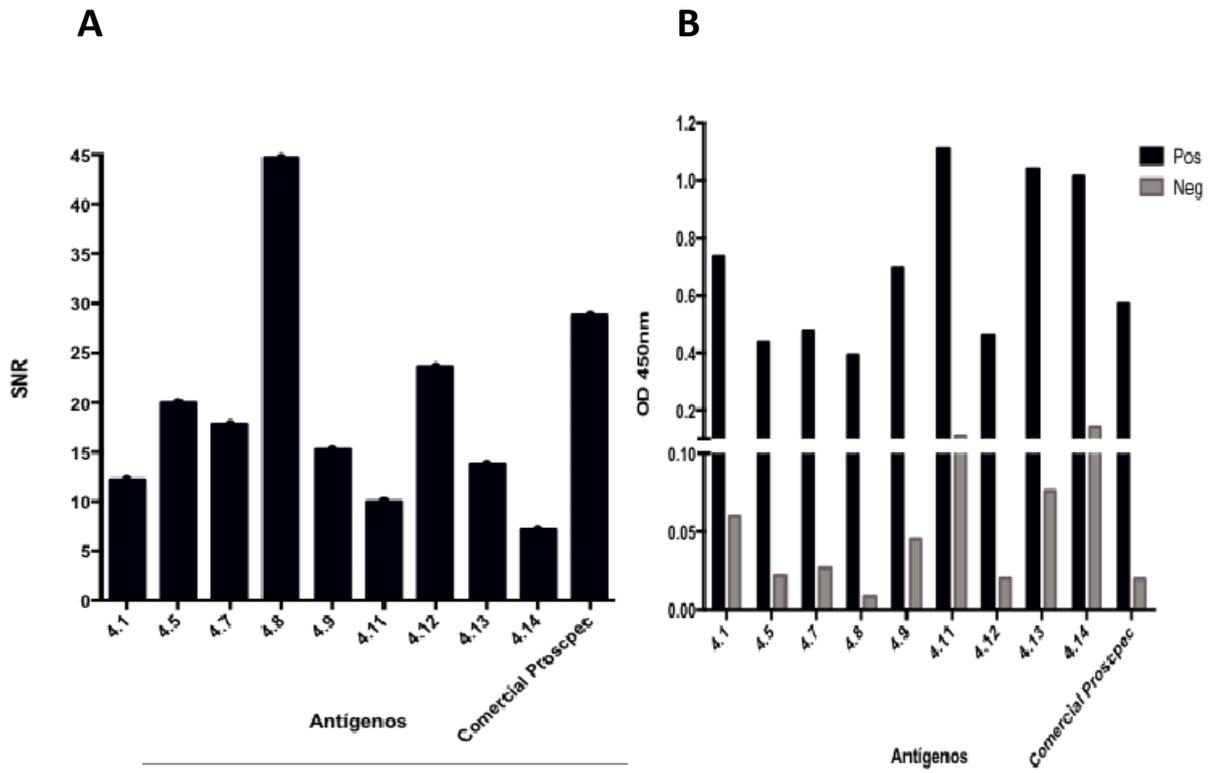


FIGURA 12

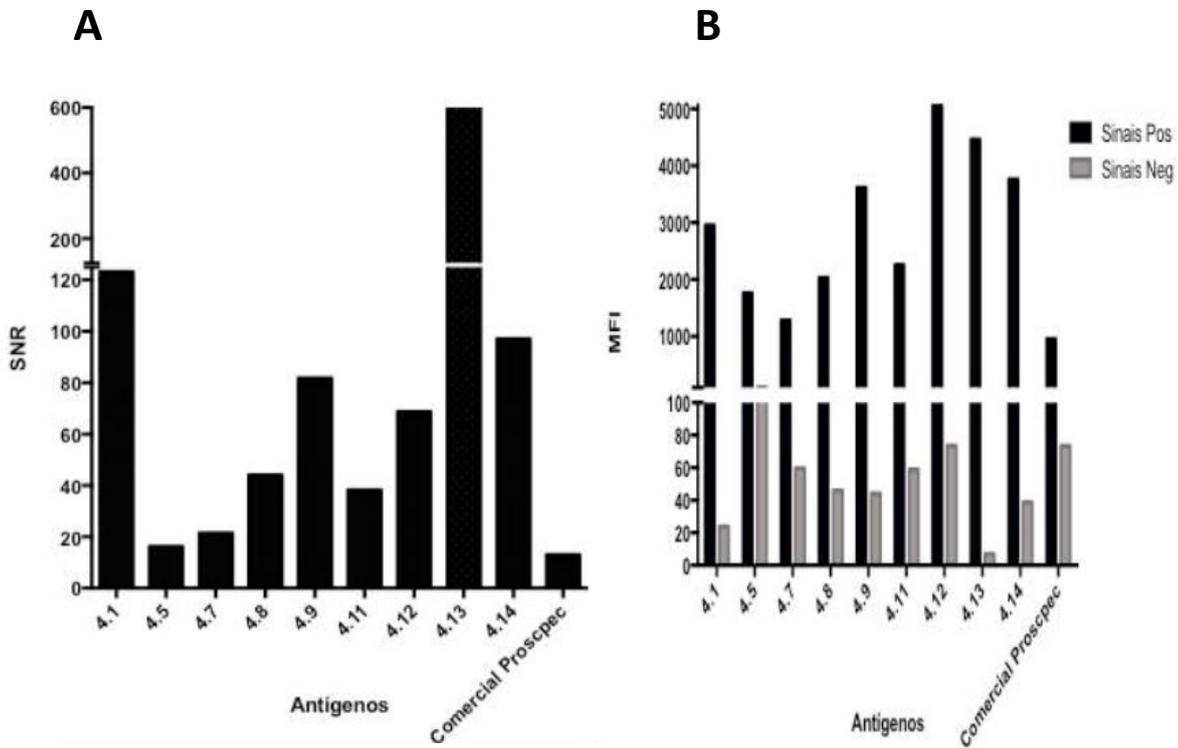
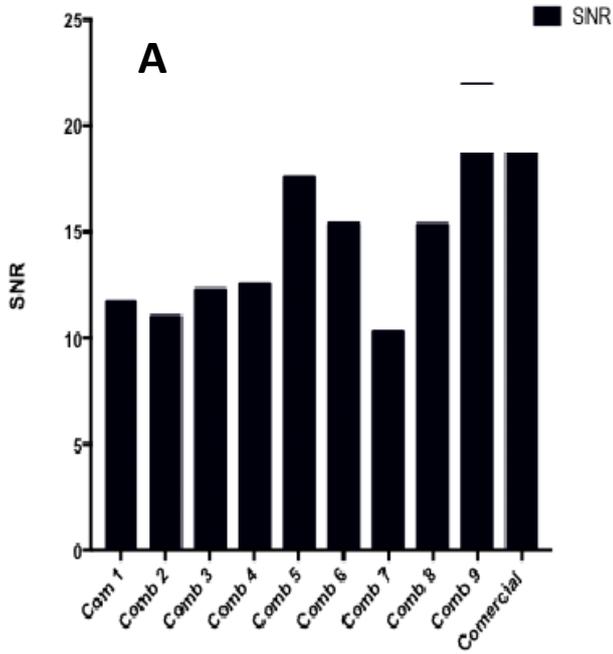
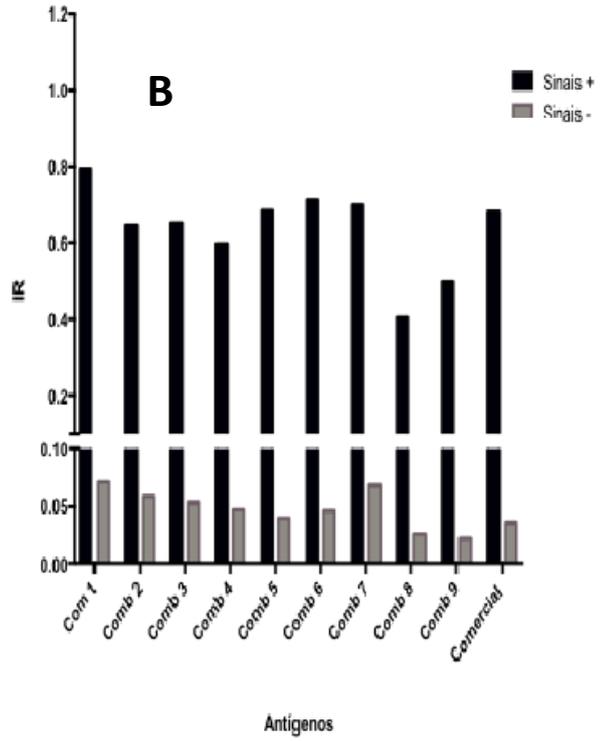


FIGURA 13

A



B



C

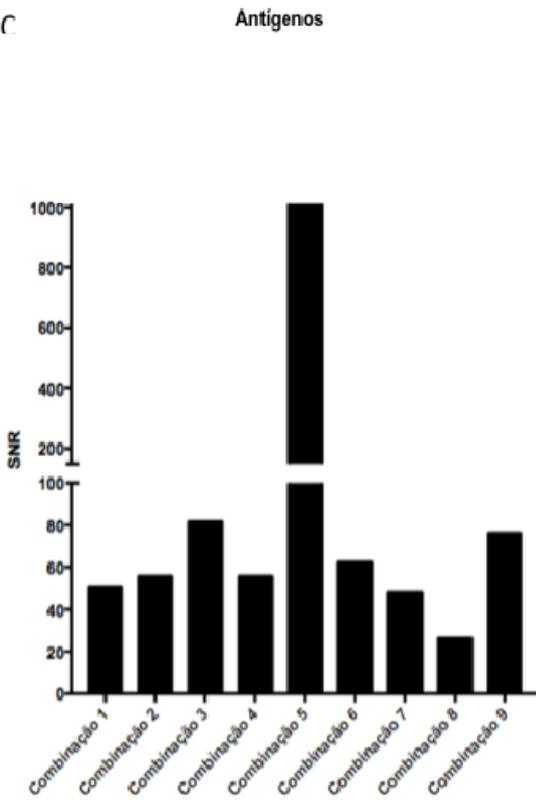


FIGURA 14

FIGURA 15

RESUMO

“POLIPEPTÍDEO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, KIT PARA TRIAGEM IMUNOLÓGICA DE HCV E/OU DIAGNÓSTICO DE HEPATITE C, COMPOSIÇÃO, USO DE PELO MENOS UM POLIPEPTÍDEO, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO, PARA TRIAGEM IMUNOLÓGICA DE HCV E PARA O DIAGNÓSTICO DE HEPATITE C”

A presente invenção refere-se a polipeptídeos com atividade imunogênica, que podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto, com alta capacidade de discriminação para a triagem do vírus da hepatite C. A invenção também se refere ao ácido nucleico, cassete de expressão, vetor de expressão, célula hospedeira, método de produção dos polipeptídeos, composição, uso dos polipeptídeos, kit para triagem imunológica de HCV e/ou diagnóstico de hepatite C, bem como aos métodos para triagem imunológica de HCV e diagnóstico de hepatite C.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 136859.txt
- Data de Geração do Código: 22/10/2018
- Hora de Geração do Código: 14:33:23
- Código de Controle:
 - Campo 1: 8D408BEADBCB9B27
 - Campo 2: FFAB5A49F64600BE