República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) **PI 0111731-9 B1**

(22) Data do Depósito: 14/06/2001

(45) Data de Concessão: 05/07/2016

(54) Título: SUPORTE SÓLIDO DE IMUNOENSAIO, MÉTODOS DE DETECÇÃO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, E DE PRODUÇÃO DE UM SUPORTE SÓLIDO DE IMUNOENSAIO, E, KIT DE TESTE DE IMUNODIAGNÓSTICO

(51) Int.Cl.: G01N 33/569

(30) Prioridade Unionista: 02/04/2001 US 60/280.867, 02/04/2001 US 60/280.811, 15/06/2000 US 60/212.082

(73) Titular(es): GRIFOLS WORLDWIDE OPERATIONS LIMITED

(72) Inventor(es): DAVID Y. CHIEN, PHILLIP ARCANGEL, LAURA TANDESKE, CARLOS GEORGE-NASCIMENTO, DORIS COIT, ANGELICA MEDINA-SELBY

SUPORTE SÓLIDO DE IMUNOENSAIO, MÉTODOS DE DETECÇÃO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, E DE PRODUÇÃO DE UM SUPORTE SÓLIDO DE IMUNOENSAIO, E, KIT DE TESTE DE IMUNODIAGNÓSTICO

Campo Técnico

A presente invenção se refere de modo geral a diagnósticos virais. Em particular, a invenção se refere a um ensaio de combinação de anticorpo/antígeno para diagnosticar acuradamente a infecção do vírus da hepatite C.

Fundamentos da Invenção

O vírus da hepatite C (HCV) é a principal causa de hepatite não A, não B parenteral (NANBH) que é transmitida amplamente através de transfusão de sangue e contato sexual. O vírus está presente em 0,4 a 2,0% dos doadores. A hepatite crônica se desenvolve em cerca de 50% de infecções e desses, aproximadamente 20% de indivíduos infectados que desenvolvem cirrose no fígado que algumas vezes leva a carcinoma hepatocelular. Desse modo, o estudo e controle da doença é de importância médica.

O HCV foi primeiro identificado e caracterizado como uma causa de NANBH por Houghten et al. A seqüência genômica viral de HCV é conhecida, como são os métodos para obtenção da seqüência. Veja, *e.g.*, Publicação Internacional Nos. WO 89/04669; WO 90/11089; e WO 90/14436. O HCV tem um genoma de RNA de filamento único, de sentido positivo de 9,5 kb e é um membro da família Flaviridae de vírus. Pelo menos seis genótipos distintos, porém relacionados, do HCV, baseado na análise filogenética, foram identificados (Simmonds et al., *J. Gen. Virol.* (1993) 74: 2391-2399). O vírus codifica uma única poliproteína tendo mais do que 3000 resíduos de amino ácido (Choo et al., *Science* (1989) 244: 359-362; Choo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1991) 88: 2451-2455; Han et

al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88: 1711-1715). A poliproteína é processada com co- e pós-tradução em ambas as proteínas estruturais e não estruturais (NS).

Em particular, como mostrado na Figura, várias proteínas são codificadas pelo genoma do HCV. A ordem e nomenclatura dos produtos de clivagem da poliproteína do HCV é como se segue: NH_2-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. Clivagem inicial da poliproteína é catalisada por proteases de hospedeiro que libera três proteínas estruturais, a proteína neocapsida com N terminal (denominada "núcleo") e duas glicoproteínas envelope, "E'" (também conhecida como E) e "E2" (também conhecida como E2/NS1), assim como proteínas não estruturais (NS) que contêm as enzimas virais. AS regiões NS são denominadas NS2, NS3, NS4 e NS5. NS2 é uma proteína de membrana integral com atividade proteolítica. NS2, tanto sozinha quanto em combinação com NS3, cliva a ligação sisle NS2-NS3 que por sua vez gera o N terminal de NS3 e libera um poliproteína grande que inclui atividades de protease de serina e helicase de RNA. Protease NS3 serve para processar a poliproteína proteína remanescentes. Término da maturação da poliproteína é iniciada por clivagem autocatalítica na junção NS3-NS4a, catalisada pela protease de serina de NS3. Clivagens mediadas por NS3 subsequentes da poliproteína do HCV parecem envolver o reconhecimento das junções de clivagem de poliproteína por uma molécula de NS3 de um outro polipeptídeo. Nessas reações, NS3 libera um cofator NS3 (NS4a), duas proteínas (NS4b e NS5a), e uma polimerase de RNA dependente de RNA (NS5b).

Vários polipeptídeos gerais e específicos úteis como

reagentes imunológicos e diagnósticos para HCV, derivados da poliproteína do HCV, foram descritos. Veja, *e.g.*, Houghton et al., Publicação Européia Nos. 318.216 e 388.232; Choo et al., *Science* (1989) 244: 359-362; Kuo et al., *Science* (1989) 244: 362-364; Houghton et al., *Hepatology* (1991) 14: 381-388; Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA (1992) 89: 10011-10015; Chien et al., *J. Gastroent. Hepatol.* (1993) 8: S33-39; Chien et al., Publicação Internacional No. WO 98/00365; Chien, D. Y., Publicação Internacional No. WO 94/01778. Essas publicações fornecem um fundamente extenso sobre HCV de modo geral, assim como sobre a manufatura e usos de reagentes imunológicos de polipeptídeo do HCV.

Métodos específicos e sensível para seleção e identificação de veículos do HCV e produtos de sangue ou sangue contaminado com HCV forneceriam um avanço importante na medicina. Hepatite pós transfusão (PTH) ocorre aproximadamente em 10% dos pacientes submetidos a transfusão, e o HCV soma até 90% desses casos. Cuidado com paciente assim como prevenção e transmissão do HCV por produtos de sangue e sangue ou por contato pessoal íntimo requerem ferramentas de prognóstico e diagnóstico. Desse modo, vários ensaios foram desenvolvidos para a serodiagnose da infecção por HIV. Veja, *e.g.*, Choo et al., *Science* (1989) 244: 359-362; Kuo et al., *Science* (1989) 244: 362-364; Choo et al., *Br. Med. Bull.* (19990) 46: 423-441; Ebeling et al., *Lancet* (1990) 335: 982-983; van der Poel et al., *Lancet* (1990) 335: 558-560; van der Poel et al., *Lancet* (1991) 337: 317-319; Chien, D. Y., Publicação Internacional No. WO 94/01778; Valenzuela et al.,

Publicação Internacional No. WO 97/44469; e Kashiwakuma et al., Patente US No. 5.871.904.

Um problema significante encontrado com alguns ensaios à base de soro é que existe um intervalo grande entre a infecção e detecção do vírus, freqüentemente 80 dias. Esse intervalo de ensaio cria grande risco para recipientes de transfusão de sangue. Para superar este problema, testes à base de anticorpo (NAT) que detectam RNA viral diretamente, e testes de antígeno de núcleo do HCV daquele ensaio de antígeno viral ao invés de resposta ao anticorpo, foram desenvolvidos. Veja, *e.g.*, Kashiwakuma et al., Patente US No. 5.871.904; Beld et al., *Transfusion* (2000) 40: 575-579.

Entretanto, permanece uma necessidade por ferramentas de prognósticos e diagnóstico acuradas e sensíveis a fim de fornecer cuidado adequado ao paciente assim como prevenir a transmissão de HCV pelo sangue e produtos com sangue ou por contato pessoal íntimo.

Descrição Resumida Invenção

A presente invenção está baseada em parte, na verificação de que anticorpos de soroconversão do HCV são tipicamente anti-núcleo e anti-NS3 (helicase). Desse modo, a invenção fornece um ensaio de combinação de anticorpo de NS3 e antígeno de núcleo que pode detectar tanto antígenos do HCV quanto anticorpos presentes em uma amostra usando uma matriz sólida única.

Assim, em uma realização, a invenção é direcionada a um suporte sólido de imunoensaio compreendendo pelo menos um anticorpo anti-núcleo do HCV e pelo menos um epítope NS3/4a do HCV isolado ligado ao mesmo. O anticorpo e

epítope NS3/4a pode ser qualquer das moléculas descritas aqui. Adicionalmente, o suporte sólido pode incluir qualquer dos antígenos de fusão de epítope descritos aqui, tal como anticorpo de fusão de epítope múltiplo compreendendo a seqüência de amino ácido descrita nas Figuras 7A-7F.

Em certas realizações, o suporte sólido compreende pelo menos dois anticorpos anti-núcleo do HCV ligado ao mesmo. Além do mais, o anticorpo anti-núcleo pode ser um anticorpo monoclonal. Adicionalmente, o epítope NS3/4a pode ser um epítope conformacional, tal como um epítope NS3/4a conformacional compreendendo a seqüência de amino ácido descritas nas Figuras 4A-4D.

Em uma outra realização, a invenção é direcionada a um suporte sólido de imunoensaio compreendendo pelo menos dois anticorpos monoclonais anti-núcleo do HCV e pelo menos um epítope conformacional NS3/4a compreendendo a seqüência de amino ácido descrita nas Figura 4A-4D, ligadas ao mesmo.

Ainda em uma outra realização, a invenção é direcionada a um método de detecção de infecção por HIV em uma amostra biológica. O método compreende: (a) fornecimento de um suporte sólido de imunoensaio como descrito acima; (b) combinação de uma amostra biológica com o suporte sólido sob condições que permitem que antígenos e anticorpos do HCV, quando presentes na amostra biológica, se aglutinem a pelo menos um anticorpo anti-núcleo e ao epítope NS3/4a, respectivamente; (c) adição ao suporte sólido da etapa (b) sob condições de formação de complexo de (i) um primeiro anticorpo detectavelmente marcado, em que dito primeiro anticorpo detectavelmente marcado é um

anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado, em que dito anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítope de núcleo do HCV diferente do que pelo menos um anticorpo anti-núcleo ligado ao suporte sólido; (ii) um antígeno que reage com um anticorpo do HCV da amostra biológica reativa com dito epítope NS3/4a; e (iii) um segundo anticorpo detectavelmente marcado, em que dito segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com o antígeno de (ii); e (d) detecção de complexos formados entre os anticorpos e antígenos, se houver, como uma indicação de infecção por HIV na amostra biológica. O epítope de NS3/4a pode ser um epítope conformacional, tal como um epítope conformacional tendo a seqüência NS3/4a descrita nas Figuras 4A-4D.

Ainda em uma outra realização, a invenção se refere a um método de detecção de infecção por HCV em uma amostra biológica. O método compreende: (a) fornecimento de um suporte sólido de imunoensaio com pelo menos dois anticorpos anti-núcleo do HCV ligados ao mesmo, como descrito acima; (b) combinação de uma amostra biológica com dito suporte sólido sob condições que permitem que anticorpos e antígenos do HCV, quando presentes na amostra biológica, se aglutinem ao dito pelo menos dois anticorpos anti-núcleo e dito epítope NS3/4a, respectivamente; (c) adição do suporte sólido da etapa (b) sob condições de formação de complexo (i) um primeiro anticorpo detectavelmente marcado, em que dito primeiro anticorpo detectavelmente marcado é um anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado, em que dito anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítope de núcleo do HCV

diferente do que os pelo menos dois anticorpos anti-núcleo ligado ao suporte sólido; (ii) um epítope da região c33c da poliproteína do HCV fundida a uma seqüência de amino ácido de hSOD; e (iii) um segundo anticorpo detectavelmente marcado, em que dito segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com a seqüência de amino ácido de hSOD; (d) detecção de complexos formados entre os anticorpos e antígenos, se houver, como uma indicação de infecção por HIV na amostra biológica. O epítope NS3/4a pode ser um epítope conformacional, tal como um epítope conformacional tendo a seqüência NS3/4a descrita nas Figura 4A-4D.

Em qualquer uma das realizações acima, o anticorpo anti-núcleo pode ser direcionado contra uma região com N terminal do antígeno núcleo do HCV, tal como contra os amino ácidos 10-53 do HCV, numerados em relação a seqüência de poliproteína de HCV1 e dito anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado é direcionado contra a região com C terminal do anticorpo núcleo do HCV, tal como os amino ácidos 120-130 do HCV, numerados em relação a seqüência de poliproteína do HCV1. Além do mais, o anticorpo que reage com um anticorpo do HCV da amostra biológica pode ser da região NS3, tal como um epítope da região c33c da poliproteína do HCV e pode ser fundido a uma seqüência de amino ácido de superóxido dismutase humana (hSOD). Neste realização, o segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com a seqüência de amino ácido de hSOD.

Em uma outra realização, a invenção é direcionada a um método de detecção de infecção por HCV em uma amostra biológica. O método compreende: (a) fornecimento de um suporte sólido de imunoensaio incluindo dois anticorpos

monoclonais anti-núcleo do HCV e um epítope conformacional compreendendo a seqüência de amino ácido descrita nas Figuras 4A-4D; (b) combinação de uma amostra biológica com dito suporte sólido sob condições que permitem que anticorpos e antígenos do HCV, quando presentes na amostra biológica, se aglutinem aos ditos pelo menos dois anticorpos anti-núcleo e dito epítope conformacional NS3/4a, respectivamente; (c) adição ao suporte sólido da etapa (b) sob condições de formação de complexo de (i) um primeiro anticorpo detectavelmente marcado, em que dito primeiro anticorpo detectavelmente marcado é um anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado, em que dito anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítope de núcleo do HCV diferente do que os pelo menos dois anticorpos anti-núcleo ligados ao suporte sólido; (ii) um epítope da região c33c da poliproteína do HCV fundida a uma seqüência de amino ácido de hSOD; e (iii) de um segundo anticorpo detectavelmente marcado, em que dito segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com a seqüência de amino ácido de hSOD; (d) detecção de complexos formados entre os anticorpos e antígenos, se houver, como uma indicação de infecção por HIV na amostra biológica.

Em certas realizações, os pelo menos dois anticorpos anti-núcleo são direcionados contra uma região com N terminal do anticorpo de núcleo do HCV, tal como contra os amino ácidos 10-53 do HCV, numerados em relação à poliproteína do HCV1, e o anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado é direcionado contra uma região com C terminal do antígeno núcleo do HCV, tal como contra os amino ácidos 120-130 do HCV, numerados em relação à

seqüência de poliproteína do HCV1.

Em uma outra realização, a invenção é direcionada a um método de detecção de infecção do HCV em uma amostra biológica. O método compreende: (a) fornecimento de um suporte sólido de imunoensaio que inclui um antígeno de fusão de epítope múltiplo; (b) combinação de uma amostra biológica com dito suporte sólido sob condições que permitem que anticorpos e antígenos do HCV, quando presentes na amostra biológica, se aglutinem ao dito pelo menos um anticorpo anti-núcleo e dito epítope NS3/4a, e o antígeno de fusão do epítope múltiplo; (c) adição ao suporte sólido da etapa (b) sob condições de formação de complexo de (i) um primeiro anticorpo detectavelmente marcado, em que dito primeiro anticorpo detectavelmente marcado é um anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado, em que dito anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítope de núcleo do HCV diferente do que pelo menos um anticorpo anti-núcleo ligado ao suporte sólido; (ii) primeiro e segundo antígenos que reagem com um anticorpo do HCV da amostra biológica reativa com dito epítope NS3/4a e dito antígeno de fusão do epítope múltiplo, respectivamente; e (iii) um segundo anticorpo detectavelmente marcado, em que dito segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com os antígenos de (ii); (d) detecção de complexos formados entre os anticorpos e antígenos, se houver, como uma indicação de infecção por HCV na amostra biológica.

O anticorpo anti-núcleo pode ser direcionado contra uma região com N terminal do anticorpo núcleo do HCV e dito primeiro anticorpo do HCV detectavelmente marcado pode ser

direcionado contra uma região com C terminal do anticorpo núcleo do HCV, como descrito acima. Além do mais, o primeiro antígeno que reage com um anticorpo do HCV da amostra biológica pode compreender um epítope da região c33c da poliproteína do HCV, e pode ser fundida com uma seqüência de amino ácido de hSOD. Neste contexto, o segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com a seqüência de amino ácido de hSOD. Adicionalmente, o segundo anticorpo que reage com um anticorpo do HCV da amostra biológica pode compreender um epítope da região c22 da poliproteína do HCV, tal como um epítope compreendendo os amino ácidos Lys_{10} a Ser_{99} da poliproteína do HCV, com uma deleção da Arg 47 e uma substituição de Leu por Trp na posição 44, numerada em relação à seqüência de poliproteína do HCV1. O epítope pode ser fundido com uma seqüência de amino ácido de hSOD. Se for assim, o seguindo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com a seqüência de amino ácido do hSOD. O antígeno de fusão do epítope múltiplo pode compreender a seqüência de amino ácido descrita nas Figuras 7A-7F.

Ainda em uma outra realização, a invenção se refere a um método de detecção de HCV em uma amostra biológica, dito método compreendendo: (a) fornecimento de um suporte sólido de imunoensaio que compreende pelo menos dois anticorpos monoclonais anti-núcleo do HCV, um epítope conformacional NS3/4a do HCV compreendendo a seqüência de amino ácido descrita nas Figuras 4A-4D, e um antígeno de fusão de epítope múltiplo compreendendo a seqüência de amino ácido descrita nas Figuras 7A-7F, ligadas ao mesmo; (b) combinação de uma amostra biológica com dito suporte sólido sob condições que permitem que anticorpos e antígenos do

HCV, quando presentes na amostra biológica, se aglutinem aos ditos pelo menos dois anticorpos anti-núcleo e dito epítope conformacional NS3/4a, e dito antígeno de fusão do epítope múltiplo, respectivamente; (c) adição ao suporte sólido da etapa (b) sob condições de formação de complexo de (i) um primeiro anticorpo detectavelmente marcado, em que dito primeiro anticorpo detectavelmente marcado é um anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado, em que dito anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítope de núcleo do HCV diferente do que os pelo menos dois anticorpos anti-núcleo ligados ao suporte sólido; (ii) um epítope da região c33c da poliproteína do HCV fundida a uma seqüência de amino ácido de hSOD e um epítope da região c22 da poliproteína do HCV fundida a uma seqüência de amino ácido de hSOD; e (iii) um segundo anticorpo detectavelmente marcado, em que dito segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com ditas seqüências de amino ácidos de hSOD; (d) detecção de complexos formados entre os anticorpos e antígenos, se houver, como uma indicação de infecção por HIV na amostra biológica.

Nesta realização, os pelo menos dois antígenos anti-núcleo podem ser direcionados contra uma região com N terminal do anticorpo de núcleo do HCV, tal como contra os amino ácidos 10-53 do HCV, numerados em relação à poliproteína do HCV1, e o anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado é direcionado contra uma região com C terminal do antígeno núcleo do HCV, tal como contra os amino ácidos 120-130 do HCV, numerados em relação à seqüência de poliproteína do HCV1. Além do mais, o epítope da região c22 pode compreender amino ácidos Lys_{10} a Ser_{99} da

poliproteína do HCV, com a deleção da Arg_{47} e uma substituição de Leu por Trp na posição 44, numerados em relação à seqüência de poliproteína do HCV1.

Em outra realização, a invenção é direcionada a kits de teste imunodiagnóstico compreendendo o suporte sólido de imunoensaio descrito acima, e instruções para condução do teste de imunodiagnóstico.

Ainda em realizações adicionais, a invenção é direcionada a métodos de produção de um suporte sólido de imunoensaio, compreendendo: (a) fornecimento de um suporte sólido; e (b) aglutinação de pelo menos um anticorpo anti-núcleo do vírus da hepatite C (HCV), tal como um ou dois ou mais, e pelo menos um epítope NS3/4a do HCV isolado ao mesmo, e opcionalmente, um antígeno de fusão do epítope múltiplo ao mesmo. Os anticorpos anti-núcleo, epítopes NS3/4a e antígenos de fusão de epítopo múltiplo são como descrito acima.

Em realizações adicionais, a invenção é direcionada a um antígeno de fusão de epítope múltiplo compreendendo a seqüência de amino ácido descrita nas Figura 7A-7F, ou uma seqüência de amino ácido com pelo menos 80% de identidade de seqüência, tal como 90% ou mais de identidade com a seqüência, a qual rege especificamente com anticorpos anti-HCV presentes em uma amostra biológica de um indivíduo infectado com HCV. Em certas realizações, o antígeno de fusão de epítope múltiplo consiste na seqüência de amino ácido descrita nas Figuras 5A-5F.

Em realizações adicionais, a invenção é direcionada a um poliproteína compreendendo uma seqüência codificadora para o anticorpo de fusão de epítope múltiplo acima, um

vetor recombinante compreendendo os polinucleotídeos, células hospedeiras transformadas com os vetores recombinantes, e métodos de produção de um antígeno fusão de epítope múltiplo recombinante compreendendo: (a) fornecimento de uma população de células hospedeiras conforme definido acima; e (b) cultura da dita população de célula sob condições por meio das quais o antígeno de fusão de epítope múltiplo codificado pela seqüência codificadora presente no dito vetor recombinante é expresso.

Esses e outros aspectos da presente invenção se tornarão evidentes em referência à seguinte descrição detalhada e desenhos em anexo.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 é uma representação diagramática do genoma do HCV, mostrando as várias regiões da poliproteína da qual os presentes reagentes de ensaio (proteínas e anticorpos) são derivados.

A Figura 2 é um desenho esquemático de um ensaio de combinação de anticorpo/antígeno representativo segundo a invenção.

A Figura 3 mostra a seqüência de amino ácido de um antígeno conformacional NS3/4a representativo para uso no presente ensaio. A alanina dobrada na posição 182 é substituída pela serina nativa normalmente presente nesta posição.

As Figuras 4A até 4D mostram o DNA e a seqüência de amino ácido correspondente de um outro antígeno conformacional NS3/4a representativo para uso nos presentes ensaios. Os amino ácidos nas posições 403 e 404 das Figura 4A a 4D representam substituições de Pro por Thr, e Ile por

Ser, da seqüência de amino ácido nativa de HCV-1.

A Figura 5 é um diagrama da construção de pd.HCV1a.ns3ns4aPI.

A Figura 6 é uma representação diagramática de MEFA 12.

As Figuras 7A-7F mostram o DNA e seqüência de amino ácido correspondente de MEFA 12.

A Figura 8 é um desenho esquemático de um imunoensaio segundo a invenção, usando MEFA 12.

Descrição Detalhada da Invenção

A prática da presente invenção irá empregar, a menos que de outro modo indicado, métodos convencionais de química, bioquímica, técnicas de DNA recombinantes e imunologia, conhecidos do estado da técnica. Tais técnicas são explicadas completamente na literatura. Veja, *e.g.*, *Fundamental Virology*, 2nd edição, vol I e II (B. N. Field and D. M. Knipe, eds.); *Handbook of Experimental Immunology*, vols. I-IV (D.M. Weir and C. C. Blackwell eds., Blackwell Scietific Publications); T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current adition); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods in Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

Deve ser notado que, como usado neste relatório descritivo e reivindicações, as formas singulares "um(a)" e "o(a)" incluem correspondentes no plural a menos que o teor indique claramente de modo diferente. Assim, por exemplo, referência a "um antígeno" inclui uma mistura de dois ou

mais antígenos, e similares.

As seguintes abreviações de amino ácido são usadas por todo o texto:

Alanina: Ala(A)

Arginina: Arg (R)

Asparagina: Asn(N)

Ácido aspártico: Asp (D)

Cisteína: Cys (C)

Glutamina: Gln (Q)

Ácido glutâmico: Glu (E)

Glicina: Gly (G)

Histidina: His (H)

Isoleucina: Ile (I)

Leucina: Leu (L)

Lisina: Lys (K)

Metionina: Met (M)

Fenilalanina: Phe (F)

Prolina: Pro (P)

Serina: Ser (S)

Treonina: Thr (T)

Triptofano: Trp (W)

Tirosina: Tys (Y)

Valina: Val (V)

I. Definições

Na descrição da presente invenção, os seguintes termos serão empregados, e são destinados a serem definidos como indicado abaixo.

Os termos "polipeptídeo" e "proteína" se referem a um polímero de resíduos de amino ácido e não são limitados a um comprimento mínimo do produto. Assim, peptídeos,

oligopeptídeos, dímeros, multímeros, e similares, são incluídos dentro da definição. Tanto proteínas de comprimento completo quanto fragmentos das mesmas estão englobados pela definição. Os termos também incluem modificações de pós-expressão do polipeptídeo, por exemplo, glicosilação, acetilação, fosforilação e similares. Além do mais, para propósitos da presente invenção, um "polipeptídeo" se refere a uma proteína que inclui modificações, tais como deleções, adições e substituições (geralmente conservadoras de natureza, à seqüência nativa, a fim da proteína manter a atividade desejada. Essas modificações podem ser liberadas, como através de mutagênese direcionada a sítio, ou podem ser acidentais, tais como através de mutações de hospedeiros que produzem as proteínas ou erros devido à amplificação de PCR.

Um polipeptídeo do HCV é um polipeptídeo, como definido acima, derivado da poliproteína do HCV. O polipeptídeo necessita não ser fisicamente derivado do HCV, mas pode ser sinteticamente ou recombinantemente produzido. Além do mais, o polipeptídeo pode ser produzido a partir de quaisquer das várias linhagens do HCV, tais como de linhagens 1, 2, 3 ou 4 do HCV. Várias regiões variáveis e conservadas são conhecidas entre essas linhagens e, em geral, as seqüência se amino ácido de epítopes derivados dessas regiões terão um alto grau de homologia de seqüência, *e.g.*, uma homologia de seqüência de amino ácido de mais do que 30%, preferencialmente mais do que 40%, quando as duas seqüências são alinhadas. Assim, por exemplo, o termo polipeptídeo "NS3/4a" se refere a NS3/4a nativo de qualquer das várias linhagens do HCV, assim como

análogos NS3/4a, muteínas e fragmentos imunogênicos, como definido adicionalmente abaixo. Os genótipos completos de muitos dessas linhagens são conhecidos. Veja, *e.g.*, Patente US No. 6.150.087 e GenBank Nos. de acesso AJ238800 e AJ238799.

Os termos "análogo" e "muteína" se referem a derivados biologicamente ativos da molécula referência, ou fragmentos de tais derivados, que retêm atividade desejada, tal como imunoreatividade nos ensaios descritos aqui. Em geral, o termo "análogo" se refere a compostos tendo uma seqüência de polipeptídeo e estrutura com uma ou mais adições, substituições (geralmente conservantes de natureza) e/ou deleções de amino ácidos, em relação à molécula nativa, a fim das modificações não destruírem a atividade imunogênica. O termo "muteína" se refere a peptídeos tendo uma ou mais cópias de peptídeo ("peptóides"), tais como aqueles descritos na Publicação Internacional No. WO 91/04282. Preferencialmente, o análogo ou muteína tem pelo menos a mesma imunoreatividade que a molécula nativa. Método para fazer análogos de polipeptídeo e mutepinas são conhecidos na técnica e são descritos adicionalmente abaixo.

Análogos particularmente preferido incluem substituições que são consecutivas na natureza, i.e., aquelas substituições que ocorrem dentro de uma família de amino ácidos que são relacionadas em suas cadeias laterais. Especificamente, amino ácidos são geralmente divididos em quatro famílias: (1) ácido - aspartato e glutamato; (2) básico - lisina, arginina, histidina; (3) não polar - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina,

fenilalanina, metionina, triptofano; e (4) polar não carregada - glicina, asparagina, glutamina, cisteína, treonina serina, tirosina. Fenilalanina, triptofano, e tirosina são às vezes classificados como amino ácidos aromáticos. Por exemplo, é razoavelmente predito que uma substituição isolada de leucina por isoleucina ou valina, um aspartato com um glutamato, uma treonina com uma serina, ou uma substituição conservadora similar de um amino ácido com um amino ácido relacionado estruturalmente, não terá um efeito maior na atividade biológica. Por exemplo, o polipeptídeo de interesse inclui até cerca de 5-10 substituições de amino ácido não conservante, ou mesmo até cerca de 15-25 substituições de amino ácido não conservantes ou conservantes, ou qualquer inteiro entre 5-25, a fim da função desejada da molécula permanece intacta. Um técnico no assunto pode prontamente determinar regiões da molécula de interesse que pode tolerar variação por referência a Hopp/Woods e Kyte-Doolittle plots, bem conhecidos na técnica.

Por "fragmento" entende-se um polipeptídeo consistindo em somente uma parte da seqüência e estrutura de polipeptídeo de comprimento completo. O fragmento pode incluir uma deleção de C terminal e/ou deleção de N terminal do polipeptídeo nativo. Um "fragmento imunogênico" de uma proteína de HCV particular incluirá geralmente pelo menos cerca de 5-10 resíduos de amino ácido contíguo da molécula de comprimento completo, preferencialmente pelo menos cerca de 15-25 resíduos de amino ácidos da molécula de comprimento completo, e mais preferencialmente a pelo menos cerca de 20-50 ou mais resíduos de amino ácido

contíguos da molécula de comprimento completo, que definem um epítope, ou qualquer inteiro entre 5 amino ácidos e seqüência de comprimento completo, desde que o fragmento em questão retenha imunoreatividade nos ensaios descritos aqui. Por exemplo, fragmentos imunogênicos preferidos, incluem mas não estão limitados a fragmentos do núcleo do HCV que compreende, *e.g.*, os amino ácidos 10-45, 10-53, 67-88, e 120-130 da poliproteína, epítope 5-1-1 (na região NS3 do genoma viral) assim como epítopes definidos de regiões de E1, E2, c33c (NS3), c100 (NS4), NS3/4a e NS5 da poliproteína, assim como de qualquer outros vários epítopes identificados da poliproteína do HCV. Veja, *e.g.*, Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA (1992) 89: 10011-10015; Chien et al., *J. Gastroent. Hepatol.* 91993) 8: S33-39; Chien et al., Publicação Internacional No. WO 93/00365; Chien, D. Y., International Publication No. WO 94/01778; Patente US No. 6.150.087 e 6.121.020.

O termo "epítope" como aqui usado se refere a uma seqüência de pelo menos cerca de 3 a 5, preferencialmente cerca de 5 a 10 ou 15, e não mais do que cerca de 1000 amino ácidos (ou qualquer inteiro entre eles), que definem uma seqüência por ela mesma ou como parte de uma seqüência maior, se aglutina a um anticorpo gerado em resposta a tal seqüência. Não existe nenhum limite crítico do comprimento do fragmento, que pode compreender próximo do comprimento completo da seqüência de proteína, ou mesmo uma proteína de fusão compreendendo dois ou mais epítopes da poliproteína do HCV. Um epítope para uso na invenção não está limitado a um polipeptídeo tendo a seqüência exata da porção da proteína de origem da qual é derivada. Na verdade, genomas

virais estão em um estado de constante fluxo e contêm vários domínios que apresentam graus relativamente altos de variabilidade entre isolados. Assim o termo "epítope" engloba seqüências idênticas à seqüência nativa, assim como modificações à seqüência nativa, tais como deleções, adições e substituições (geralmente conservadoras de natureza).

Regiões de um dado polipeptídeo que incluem um epítope podem ser identificados usando qualquer número de técnicas de mapeamento de epítope, bem conhecidos na técnica. Veja, *e.g.*, *Epitope Mapping Protocols* em Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totwa, NJ. Por exemplo, epítopes lineares podem ser determinados por *e.g.*, síntese concorrente de grandes números de peptídeos em suportes sólidos, os peptídeos correspondendo a porções da molécula de proteína, e reagindo os peptídeos com anticorpos enquanto os peptídeos são ainda ligados aos suportes. Tais técnicas são conhecidas na arte e descritas em, *e.g.*, Patente US No. 4.708.871; Geysen et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci* USA 81: 3998-4002; Geysen et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci* USA 82: 178-182; Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23: 709-715. Usando tais técnicas, vários epítopes de HCV foram identificados. Veja, *e.g.*, Chien et al., *Viral Hepatitis and Liver Disease* (1994) pp. 320-324, e adicionalmente abaixo. Similarmente, epítopes conformacionais são prontamente identificados determinando conformação espacial de amino ácidos tal como por, *e.g.*, cristalografia de raio X e ressonância magnética nuclear de 2 dimensões. Veja, *e.g.*, *Epítome Mapping Protocols, supra*. Regiões antigênicas

de proteína podem também ser identificadas usando antigenicidade padrão e hidropatia, tais como aqueles calculados usando, *e.g.*, o programa software versão 1.0 Omiga disponível junto a Oxford Molecular Group. Este programa de computador emprega o método Hopp/Woods, Hoop et al., *Proc. Natl. Acad. Sci* USA (1981) 78: 3824-3828 para determinar perfis de antigenicidade, e as técnicas de Kyte-Doolittle, Kyte et al., *J. Mol. Biol.* (1982) 157: 105-132 para mapas de hidropatia.

Como aqui usado, o termo "epítope 'conformacional" se refere a uma porção de uma proteína de comprimento completo, ou um análogo ou mutepina do mesmo, tendo características estruturais nativas á seqüência de amino ácido codificando o epítope dentro da proteína natural de comprimento completo. Características estruturais nativas incluem, mas não estão limitadas a, glicosilação e estrutura tridimensional. O comprimento da seqüência que define o epítope pode ser submetido a váriações desses epítopes, que acredita-se que sejam formados, por forma tridimensional do antígeno (*e.g.*, dobramento). Assim, amino ácidos definido epítope podem ser relativamente poucos em número, mas amplamente dispersos ao longo do comprimento da molécula (ou mesmo em diferentes moléculas no caso de dímeros, etc.) sendo trazidos na conformação de epítope correta via dobramento. As porções do antígeno entre os resíduos definido o epítope podem não ser crípticas para a estrutura conformacional do epítope. Por exemplo, deleção ou substituição dessa seqüências de intervenção podem não afetar o epítope conformacional que forneceu seqüências críticas a conformação do epítope que são mantidas (*e.g.*,

cisteínas envolvidas na ligação de dissulfeto, sítios de glicolsilação, etc.).

Epítopes conformacionais presentes na região NS3/4a são prontamente identificadas usando métodos discutidos acima. Além do mais, a presença ou ausência de um epítope conformacional pode ser prontamente determinado através da seleção do antígeno de interesse com um anticorpo (soro policlonal ou monoclonal ao epítope conformacional) e comparando sua reatividade àquela de uma versão desnaturada do antígeno que retém somente epítopes lineares (se houver). Em tal seleção usando anticorpos policlonais, pode ser vantajoso absorver o soro policlonal primeiro com o antígeno desnaturado e ver se ele retém anticorpos ao antígeno de interesse. Adicionalmente, no caso de NS3/4a, uma molécula que preserva a conformação nativa também terá protease e, opcionalmente, atividades enzimáticas de helicase. Tais atividades podem ser detectadas usando ensaios enzimáticos, como descrito adicionalmente abaixo.

Preferencialmente, um epítope conformacional é produzido recombinantemente e é expresso em uma celula que é extrapivel sob condições que preservam suas características de estrutura desejada, *e.g.* sem desnaturação do epítope. Tais células incluem bactéria, levedura, inseto, e células de mamíferos. Expressão e isolamento de epítope epítopes conformacionais recombinantes da poliproteína do HCV são descritos em *e.g.* Publicação Internacional Nos. WO 96/04301, WO 94/01778, WO 95/33053, WO 92/08734. Alternativamente, é possível expressar os antígenos e ainda renaturar a proteína após recuperação. É também entendido que síntese química pode

também fornecer mimítopes de antígeno conformacional que reagem por cruzamento com epítope conformacional de antígeno "nativo".

O termo "antígeno de fusão de epítope múltiplo" ou "MEFA" como aqui usado destina-se a um polipeptídeo em que antígenos do HCV múltiplos são pártes de uma única cadeia contínua de amino ácidos, cuja cadeia não ocorre na natureza. Os antígenos do HCV podem ser conectados diretamente um ao outro por ligações de peptídeo ou podem ser separados por intervenção de seqüências de amino ácido. Os antígenos de fusão podem também conter seqüências exógenas a poliproteína do HCV. Além do mais, as seqüências do HCV presentes podem ser de múltiplos genótipos e/ou isolados do HCV. Exemplos de MEFAs particulares para uso nos presentes imunoensaios são detalhados em, *e.g.*, Publicação Internacional No. WO 97/44469, e são descritos abaixo.

Um "anticorpo" destina-se a uma molécula que, através de meio químico ou físico, se aglutina especificamente a um polipeptídeo de interesse. Assim, um anticorpo de núcleo do HCV é uma molécula que especificamente se aglutina a proteína núcleo do HCV. O termo "anticorpo" como aqui usado inclui anticorpos obtidos de preparações monoclonais e policlonais, assim como os seguintes: moléculas de anticorpo híbridas (quiméricas) (veja, por exemplo, Winter et al., (1991) Nature 349: 293-299; e Patente US No. 4.816.567); fragmentos $F(ab')_2$ e F(ab); moléculas Fv (heterodímeros não covalentes, veja, por exemplo, Inbar et al. (1972) *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2659-2662; e Ehrlich et al. (1980) *Biochem* 19: 4091-4096); moléculas de Fv de

cadeia únicxa (sFv) (veja, por exemplo, Huston et al., (1988) *Proc Natl Sci USA* 85: 5879-5883); construções de fragmento de anticorpo dimérico e trimérico minicorpos (veja, *e.g.*, Pack et al. (1992) *Biochem* 31: 1579-1584; Cumber et al. (1992) *J Immunology* 149B: 120-126); moléculas de anticorpo humanizadas (veja, por exemplo, Riechmann et al. (1988) *nature* 332: 323-327; Verhoeyan et al., (1988) *Science* 239: 1534-1536; e Publicação de Patente No. GB 2.276.169, publicada em 21 de setembro de 1994); e, quaisquer fragmentos funcionais obtidos de tais moléculas, em que tais fragmentos retêm propriedades de aglutinação imunológicas da molécula de anticorpo de origem.

Conforme aqui usado, o termo "anticorpo monoclonal" se refere a uma composição de anticorpo tendo uma população de anticorpo homogênea. O termo não está limitado com relação às espécies ou fonte do anticorpo, nem é destinado a ser limitado pela maneira na qual é feita. Assim, o termo engloba anticorpos obtidos junto a hibridomas de murino, assim como anticorpos monoclonais humanos obtidos usando preferencialmente hibridomas de murino. Veja, *e.g.*, Cote, et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 1985, p. 77.

Uma proteína "recombinante" é uma proteína que retém a atividade desejada e que foi preparada por técnicas de DNA recombinante como descrito aqui. Em geral, o gene de interesse é clonado e depois expressado em organismos, como descrito adicionalmente abaixo. O organismo hospedeiro expressa o gene exógeno para produzir a proteína sob condições de expressão.

Por "isolado" entende-se, quando referindo-se a um

polipeptídeo, que a molécula indicada é separada e diferente do organismo como um todo com o qual a molécula é encontrada na natureza ou está presente na ausência substancial de outras macromoléculas biológicas do mesmo tipo. O termo "isolado" com relação a um polinucleotídeo é uma dita molécula de ácido nucléico, no todo ou em parte, de seqüências normalmente associadas com ela na natureza; ou uma seqüência, como ela existe na natureza, mas tendo seqüências heterólogas em associação com elas; ou uma molécula dissociada do cromossomo.

Por "determinante antigênico equivalente" entende-se um determinante antigênico de subespécies ou linhagens diferentes do HCV, tais como linhagens 1, 2, ou 3 do HCV. Mais especificamente, epítopes são conhecidos, tal como 5-1-1, e tais epítopes variam entre as linhagens 1, 2 e 3. Assim, o epítope 5-1-1 das três linhagens diferentes são determinantes antigênicos equivalentes e assim são "cópias" embora suas seqüências não sejam idênticas. Em geral, as seqüências de amino ácido de determinantes antigênicos equivalentes terão um alto grau de homologia de seqüência, *e.g.* homologia de seqüência de amino ácido de mais do que 30%, preferencialmente mais do que 40%, quando as duas seqüências são alinhadas.

"Homologia" se refere ao percentual de similaridade entre dois polinucleotídeos ou duas porções de polipeptídeo. Dois DNA, ou duas seqüências de polipeptídeo são "substancialmente homólogas" entre si quando as seqüências apresentam pelo menos cerca de 50%, preferencialmente pelo menos cerca de 75%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 80-85%,

preferencialmente pelo menos cerca de 90%, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 95-98% de similaridade da seqüência sobre um comprimento definido das moléculas. Como aqui usado, substancialmente homólogos também se refere a seqüências mostrando completa identidade ao DNA especificado ou seqüência de polipeptídeo.

Em geral, "identidade" se refere a uma correspondência nucleotídeo a nucleotídeo ou amino ácido a amino ácido exata de dois polinucleotídeos ou seqüências de polipeptídeo, respectivamente. Percentual de identidade pode ser determinado por uma comparação direta da informação da seqüência entre duas moléculas por alinhamento das seqüências, contando o número exato de encaixes entre as duas seqüências alinhadas, dividindo pelo comprimento da seqüência mais curta, e multiplicando o resultado por 100.

Programas de computador prontamente disponíveis podem ser usados para auxiliar na análise de similaridade e identidade, tal como ALIGH, Dayhoff, M.O. em *Astlas of Protein Sequence and Strcture* M.O. Dayhoff ed., Suppl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta o algoritmo de homologia local de Smith and Waterman *Advances in Appl. Math.* 2: 482-489, 1981 para análise peptídeo. Programas para determinar similaridade e identidade de seqüência de nucleotídeo estão disponíveis em Wisconsin Sequence Analysis Package, Version8 (disponível junto a Genetics Computer Group, Madison, WI) por exemplo, os programas BESTFIT, FASTA e GAP, que também se baseiam no algoritmo de Smith e Waterman. Esses programas são prontamente utilizados com os

parâmetros de default recomendados pelo fabricante e descritos em Wisconsin Sequence Analysis Package referidos acima. Por exemplo, porcentagem de similaridade de uma seqüência de nucleotídeo particular a uma seqüência referencia pode ser determinada usando o algoritmo de homologia de Smith e Waterman com uma tabela de classificação default e uma penalidade de intervalo de seis posições de nucleotídeo.

Um outro método de estabelecimento de percentual de similaridade no contexto da presente invenção é para usar o pacote de programas MPSRCH da University Edinburgh, desenvolvido por John F. Collins e Shane S. Sturrok, e distribuído por Intelli Genetics, Inc. (Mountain View, CA). Deste conjunto de pacotes o algoritmo de Smith-Waterman pode ser empregado onde parâmetros de default são usados para a tabela de classificação (por exemplo, penalidade de aberta de intervalo de 12, penalidade de extensão de intervalo de um, e um intervalo de seis). Dos dados grados de valor "Match" reflete a "similaridade de seqüência". Outros programas adequados para calcular a porcentagem de identidade ou similaridade entre seqüências são geralmente conhecidas na técnica, por exemplo, um outro programa de alinhamento é BLAST, usado com parâmetros default. Por exemplo, BLASTN e BLASTP podem ser usados usando os parâmetros default: código genético = padrão; filtro = nenhum; linhagem - ambas; corte = 60; esperado = 10; matriz = BLOSUM62; descrições = 50 seqüências; variação de = alta classificação; bases de dados = não redundante, Genbanlk + EMBL + DDBJ + PBD + Gen Bank traduções CDS + proteína Swiss + Spupdate + PIR. Detalhes desse programas podem ser

encontrados nos seguintes endereços: http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST.

Alternativamente, a homologia pode ser determinada por hibridização de polinucleotídeos sob condições que formam duplexes estáveis entre regiões homólogas, seguido por digestão com nuclease(s) específicas de filamento único, e determinação de tamanho dos fragmentos digeridos. Seqüências de DNA que são substancialmente homólogas podem ser identificadas em um experimento de hibridização Southern sob, por exemplo, condições severas, como definido para aqueles sistema particular. Definição de condições de hibridização apropriadas é do conhecimento do técnico no assunto. Veja, *e.g.*, Sambrook et al., *supra*; DNA Cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

Uma "seqüência codificadora" ou uma que "codifica" um polipeptídeo selecionado, é uma molécula de ácido nucléico que é transcrita (no caso de DNA) e traduzida (no caso de mRNA) em um polipeptídeo in vitro ou in vivo quando colocada sob o controle de seqüências reguladoras apropriadas. AS vizinhanças da seqüência codificadora são determinadas por um códon de partida no 5´amino terminal e um códon de parada de tradução no 3´carbóxi terminal. Uma seqüência de terminação de transcrição pode ser localizado 3´à seqüência codificadora.

"Operacionalmente ligado" se refere a uma disposição de elementos em que os componentes assim descritos são configurados a fim de realizar sua função desejada. Assim, um dado promotor operacionalmente ligado a uma seqüência codificadora é capaz de realizar a expressão da seqüência codificadora quando fatores de transcrição próprios, etc.,

estão presentes. O promotor não necessita ser contíguo com a seqüência codificadora, a fim de que sua função direcione a expressão do mesmo. Assim, por exemplo, intervenção de seqüências transcritas ainda não traduzidas pode estar presente entre as seqüências de promotor e a seqüência codificadora, como pode íntrons transcritos, e a seqüência de promotor pode ainda ser considerada "operacionalmente ligado" à seqüência codificadora.

Um "elemento de controle" se refere a uma seqüência de polinucleotídeo que auxilia na expressão de uma seqüência codificadora a qual ele está ligado. O termo inclui promotores, seqüências de terminação de transcrição, domínios reguladores da parte superior, sinais de poliadenilação, regiões não traduzidas, incluindo 5´-UTRs e 3´-UTRs e quando apropriado, seqüências líder e melhoradores, que coletivamente fornecem a transcrição e tradução de uma seqüência codificadora em uma célula hospedeira.

Um "promotor" como aqui usado é uma região reguladora de DNA capaz de aglutinar RNA polimerase em uma célula hospedeira e iniciar transcrição de uma seqüência codificadora da parte inferior (direção 3´) e operacionalemnete ligada. Para fins da presente invenção, uma seqüência de promotor inclui um número mínimo de bases ou elementos necessários para iniciar a transcrição de um gene de interesse a níveis detectáveis acima dos conhecidos. Dentro da seqüência de promotor está um sítio de iniciação de transcrição, assim como domínios de aglutinação de proteína (seqüências de consenso) responsáveis para a aglutinação de RNA polimerase.

Promotores eucarióticos freqüentemente, mas não sempre, conterão caixas "TATA" e caixas "CAT".

Uma seqüência de controle "direciona a transcrição" de uma seqüência codificadora em uma célula quando a RNA polimerase se aglutinará à seqüência de promotor e transcreverá a seqüência codificadora em mRNA, que é depois traduzida no polipeptídeo codificado pela seqüência codificadora.

"Cassete de expressão" ou "construção de expressão" se refere a uma montagem que é capaz de direcionar a expressão da(s) seqüência(s) ou gene(s) de interesse. O cassete de expressão inclui elementos de controle, como descrito acima, tal como um promotor que é operacionalmente ligado a (para a transcrição direta da seqüência(s) ou gene(s) de interesse, e freqüentemente inclui uma seqüência de poliadenilação também. Dentro de certas realizações da invenção, o cassete de expressão descrito aqui pode estar contido dentro de uma construção de plasmídio. Além dos componentes do cassete de expressão, a construção de plasmídio pode também incluir, um ou mais marcadores selecionáveis, um sinal que permite a construção de plasmídio existir como DNA de filamento único (*e.g.*, uma origem de M13 de replicação), pelo menos um sítio de clonagem múltiplo, e uma origem de mamífero de replicação (*e.g.*, uma origem de adenovírus ou SV40 de replicação)>

"Transformação", como aqui usado, se refere à inserção de um polinucleotídeo em uma célula hospedeira, respectiva do método usado para inserção: por exemplo, transformação por apreensão direta, transfecção, infecção e similares. Por métodos particulares de transfecção, veja

abaixo. O polinucleotídeo exógeno pode ser mantido como um vetor não integrado, por exemplo, um episoma, ou alternativamente, pode ser integrado no genoma hospedeiro.

Uma "célula hospedeira" é uma célula que foi transformada, ou é capaz de transformação, por uma seqüência de DNA exógena.

"Suporte sólido comum" destina-se a uma matriz sólida única a qual os polipeptídeos do HCV usados nos imunoensaios são ligadas covalentemente ou por meios não covalentes tal como adsorção hidrofóbica.

"Imunologicamente reativo" significa que o antígeno em questão irá reagir especificamente com anticorpos anti-HCV presentes em uma amostra biológica de um indivíduo infectado com HCV.

"Complexo imune" destina-se a combinação formada quando o anticorpo se aglutina a um epítope em um antígeno.

Como aqui usado, uma "amostra biológica" se refere a uma amostra de tecido ou fluido isolado de um indivíduo, incluindo mas não limitado a, por exemplo, sangue, plasma, soro, matéria fecal, urina, medula óssea, fluido espinhal, fluido linfático, amostras da pele, secreções externas da pele, tratos respiratório, intestinal e genitourinário, salivam lágrima, leite, células do sangue, órgãos, biopsia e também amostras de constituintes de cultura de célula in vitro incluindo mas não limitado a meio condicionado resultante do crescimento de células e tecidos em meio de cultura, *e.g.*, células recombinantes, e componentes de célula.

Como aqui usado, os termo "marcação" e "detectavelmente marcada" se referem a um molécula capaz de

detecção, incluindo, mas não limitado a, isótopos radioativos, fluorescentes, quimioluminescentes, cromoforos, enzimas, substratos de enzima, cofatores de enzima, inibidores de enzima, cromóforos, corantes, íons metálicos, sóis de matl, ligantes (*e.g.*, biotina, estreptavidina ou haptens) e similares. O termo "fluorescente" se refere a uma substância ou uma porção da mesma que é capaz de apresentar fluorescência na faixa detectável. Exemplos particulares de marcações que podem ser usadas sob a invenção incluem, mas não estão limitados a, rábano peroxidase (HRP), fluoresceína, PITC, rodamina, dansila, umbeliferona, éster de acridínio de dimetila (DMAE), vermelho Texas, luminol, NADPH e α-β-galactosidase.

II. Modos de Realização da Invenção

Antes de descrever a presente invenção em detalhes, entende-se que esta invenção não está limitada a formulações particulares ou parâmetros de processo tal como podem, é claro, variar. Deve também ser entendido que a terminologia usada aqui é para o fim de descrever realizações particulares da invenção somente, e não está destinada a ser limitante.

Embora várias composições e métodos similares ou equivalente daquelas descritos aqui posam ser usados na prática da presente invenção, os materiais e métodos preferidos são descritos aqui.

Como notado acima, a presente invenção está baseada na descoberta de novos métodos de diagnóstico para detecção acurada de infecção com HCV anterior. Os métodos se baseiam na identificação e uso de anticorpos do HCV altamente imunogênico e antígenos que são presentes durante os

estágios anteriores de soroconversão do HCV, aumentando desse modo a acurácia da detecção e redução da incidência de resultados falsos. Os métodos podem ser convenientemente praticados em um único formato de ensaio.

Mais particularmente, o ensaio é conduzido em um suporte sólido ao qual foi ligado um ou mais anticorpos anti-núcleo do HCV (direcionado contra os mesmos ou diferentes epítopes núcleo do HCV) e um epítope derivado da região de NS3/4a da poliproteína do HCV. Exemplos de anticorpos anti-núcleo particulares úteis na presente invenção incluem, mas não estão limitados a, moléculas de anticorpo tal como antígenos monoclonais, direcionados contra epítopes na região núcleo encontrada entre os amino ácidos 10-53; amino ácidos 10-45; amino ácidos 67-88; amino ácidos 120-130, ou anticorpos direcionados contra qualquer dos epítopes de núcleo identificados, *e.g.*, Houghthen et al., Patente US No. 5.350.671; Chien et al. , *Proc Natl. Acad. Sci USA* (1992) 89: 10011-10015; Chien et al., *J. Gastroent. Hepatol* 91993) 8: S33-39; Chien et al. Publicação Internacional No. WO 93/00365; Chien, D.Y., Publicação Internacional No. WO 94/01778; e comumente cedido, Pedido de Patente US No. 08/403.590 e 08/444.818.

A região NS3/4a da poliproteína do HCV foi descrita e a seqüência de amino ácido e estrutura global da proteína são descritas em, *e.g.* Yao et al., *Structure* (Novembro 1999) 7: 1353-1363; Sali et al., *Biochem* (1998) 37: 3392-3401; e Bartenschlager, R. J. Viral Hepat. (1999) 6 165-181. Veja, também, Dasmahapatra et al., particularmente 5.843.752. O imunoensaio utiliza pelo menos um epítope conformacional derivado da região NS3/4a que existe na

conformação como encontrado na partícula do HCV que ocorre naturalmente ou seu produto efetivo, como evidenciado pela preservação de protease e, opcionalmente, atividades enzimáticas de helicase normalmente mostrada pelo produto de gene NS3/4a e/ou imunoreatividade do antígeno com anticorpos em uma amostra biológica de um indivíduo infectado com HCV, e uma perda da imunoreatividade do epítope quando da desnaturação do antígeno. Por exemplo, o epítope conformacional pode ser desobstruído por calor, variando o pH a extremamente ácido ou básico, ou por adição de desnaturantes orgânicos conhecidos, tal como ditiotreitol (DDT) ou um detergente apropriado. Veja, *e.g.*, *Protein Purification Methods, a practical approach* (E.L.V. Harris and S. Angal eds, IRL Press) e o produto desnaturado comparado ao produto que não é tratado como acima.

Atividade de protease e helicase pode ser determinada usando ensaios de enzima padrão bem conhecidos na técnica. Por exemplo, atividade de protease pode ser determinada usando ensaios bem conhecidos na técnica. Beja, *e.g.*, Takeshita et al., *Anal Biochem.* 91997) 247: 242-246; Kakiuchi et al., J. Biochem. (1997) 122:749-755; Sali et al., Biochemistry (1998) 37:3392-3401; Cho et al., *J.Virol. Meth.* (1998) 72: 109-115; Cerretani et al., *Anal. Biochem.* (1999) 266: 192-197; Zang et al., *Anal. Biochem.* (1999) 270: 268-275; Kakiuchi et al., *J. Virol. Meth.* (199) 80: 77-84; Fowler et al., *J. Biomol. Screen.* (2000) 5: 153-158; e Kim et al., *Anal. Biochem.* (2000) 284: 42-48. Um ensaio particularmente conveniente pata testar a atividade de protease é descrito nos exemplos abaixo.

Similarmente, ensaios de atividade de helicase são

bem conhecidos na técnica e atividade de helicase de um epítope pode ser determinado usando, por exemplo, um ensaio ELISA, como descrito em, e.g., Hsu et al., *Biochem Biophys. Res. Commun.* (1998) 253: 594-599; um sistema de ensaio de proximidade de cintilação, como descrito em Kyono et al., *Anal. Biochem.* (1998) 257: 120-126; ensaios de seleção como descrito em, *e.g.*, Hicham et al., *Antiviral Res.* (2000) 46: 181-193 e Kwong et al., *Methods Mol. Med.* (2000) 24: 97-116; assim como outros métodos de ensaio conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Khu et al., *J. Virol.* (2001) 75: 205-214; Utama et al., *Virology* (2000) 273: 316-324; Paolini et al., *J. Gen. Virol.* (2000) 81: 1335-1345; Preugschat et al., *Biochemistry* (2000) 39: 5174-5183; Preugschat et al., *Methods Mol. Med.* (1998) 19: 353-364; e Hessen et al., *Biochemistry* (2000) 39: 2619-2625.

O comprimento do antígeno é suficiente para manter um epítope conformacional imunoreativo. Freqüentemente, o polipeptídeo contendo o antígeno usado será de comprimento quase completo, entretanto, o polipeptídeo pode também ser truncado para, por exemplo, aumentar a solubilidade ou para aperfeiçoar a secreção. Geralmente, o epítope conformacional encontrado em NS3/4a é expressado como um polipeptídeo recombinante em uma célula e este polipeptídeo fornece o epítope em uma forma desejada, como descrito em detalhes abaixo.

Seqüências de amino ácido representativos para polipeptídeos de NS3/4a são mostradas na Figura 3 e Figura 4A a 4D. A alanina dobrada ocorrendo na posição 182 da Figura 3 é substituída por uma serina nativa encontrada nesta posição a fim de prevenir a autocatálise da molécula

que pode por outro lado ocorrer. A seqüência de amino ácido mostrada nas posições 2-868 das Figuras 4A a 4D corresponde a posições de amino ácido 1027-1711 do HCV-1. Um códon iniciador (ATG) codificando Met, é mostrado na posição 1.

Adicionalmente, o Thr normalmente ocorre na posição 1428 do HCV1 (posição do amino ácido 403 da Figura 4) é mutada a Pro, e a Ser normalmente ocorrendo na posição 1429 do HCV-1 (posição de amino ácido 404 da Figura 4) é mutada a Ile. Entretanto, tanto a seqüência nativa, com ou sem um Met com N terminal, o análogo descrito, com ou sem Met com N terminal, ou outros análogos e fragmentos podem ser usados nos ensaios, a fim de que o epítope seja produzido usando um método que retenha ou restabeleça sua conformação nativa de tal modo que a atividade de protease, e opcionalmente, atividade de helicase seja retida. Dasmahapatra et al., Patente US No. 5.843.752 e Zhang et al., Patente US No. 5.990.276, ambos descrevem os análogos de NS3/4a.

A protease NS3 de NS3/4a é encontrada a cerca das posições 1027-1207, numeradas em relação ao HCV-1, posições 2-182 da Figura 4. A estrutura da protease NS3 e sítio ativo são conhecidos. Veja, *e.g.*, De Francesco et al., *Antivir. Ther.* (1998) 3: 99-109; Koch et al., *Biochemistry* 92001) 40: 631-640. Variações à seqüência nativa será normalmente tolerada e estará para fora do sítio ativo da molécula. Particularmente, é desejável manter os amino ácidos 1- ou 2-155 da Figura, com poucas ou somente substituições conservantes. Os amino ácidos que ocorrem em torno de 155 irão tolerar variações maiores. Adicionalmente, se fragmentos da seqüência MS3/4a

encontrada na fi4são usados, esse fragmentos incluirão geralmente pelo menos os amino ácidos 1- ou 2-155, preferencialmente os amino ácidos 1- ou 2-175, e mais preferencialmente os amino ácidos 1- ou 2-182, com ou sem o Met com N terminal. O domínio de helicase é encontrado a cerca das posições 1193-1657 do HCV-1 (posições 207-632 da Figura 4). Assim, se a atividade de helicase é desejada, esta porção da molécula será mantida com pouca ou somente variações conservantes. Um técnico no assunto pode prontamente determinar outras regiões que irão tolerar variação baseado na estrutura conhecida do NS3/4a.

O suporte sólido pode também compreender outros antígenos. Por exemplo, antígenos de fusão de epítope múltiplos (denominado "MEFAs"), como descrito na Publicação Internacional No. Wo 97/44469, pode ser ligada ao suporte sólido para uso nos ensaios. tais MEFAs incluem epítopes múltiplos derivados de dois ou mais das várias regiões virais mostradas na Figura 1 e Tabela 1. Em particular, como mostrado na Figura 1 e Tabela 1, uma poliproteína do HCV, quando da clivagem, produz pelo menos dez produtos distintos, na ordem de NH_2-núcleo-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. O polipeptídeo núcleo ocorre nas posições 1-191, numeradas em relação ao HCV1 (veja, Choo et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88: 2451-2455, para o genoma HCV1). Este polipeptídeo é adicionalmente processado para produzir um polipeptídeo de HCV com aproximadamente os amino ácidos 1-173. Os polipeptídeos envelope, E1 e E2, correm na cerca das posições 192-383 e 384-746, respectivamente. O domínio P7 é encontrado a cerca das posições 747-809. NS2 é uma proteína

de membrana integral com atividade proteolítica e é encontrada a cerca das posições 810-1026 da poliproteína. NS2, tanto sozinho quanto em combinação com NS3 (encontrado a cerca da posições 1027-1657), cliva a ligação NS2-NS3 que por sua vez gera o N terminal do NS3 e libera uma poliproteína grande que inclui tanto atividades de protease de serina quanto helicase de RNA. A protease de NS3, encontrada a cerca das posições 1027-1207, serve para processar a poliproteína remanescente. A atividade helicase é encontrada a cerca das posições 1193-1657. O término da maturação da poliproteína é iniciada por clivagem autocatalítica na junção NS3-NS4a, catalisada pela protease de serina de NS3. Clivagens mediadas por NS3 subsequente da poliproteína do HCV parece envolver reconhecimento junções de clivagem de glicoproteína por uma molécula de NS3 de um outro polipeptídeo. Nessas reações, NS3 libera um cofator NS3 (NS4a, encontrado a cerca das posições 1658-1711), duas proteínas (NS4b encontrada a cerca das posições 1712-1972, e NS5a encontrada a cerca das posições 1973-2420), e uma polimerase de RNA dependente de RNA (NS5b encontrado a cerca das posições 2421-3011).

Tabela 1

Domínios	Ligações aproximadas
C (núcleo)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711

NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011

* Numerado em relação ao HCV1. Veja, Choo et al., (1991) *proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88:2451-2455.

Os antígenos múltiplos são parte de uma única cadeia contínua de amino ácidos cuja cadeia não ocorre naturalmente na natureza. Assim, a ordem linear dos epítopes é diferente de sua ordem linear no genoma em que eles ocorrem. A ordem linear das seqüências dos MEFAs para uso aqui é preferencialmente disposta para antigenicidade ótima. Preferencialmente, os epítopes são de mais do que uma linhagem do HCV, fornecendo assim a capacidade adicionada de detectar linhagens múltiplas do HCV em um único ensaio. Assim, os MEFAs para uso aqui podem compreender vários agentes imunogênicos derivados da poliproteína descrita acima. Além do mais, uma proteína resultante de um quadro de deslocamento na região do núcleo da poliproteína, tal como descrito na Publicação Internacional No. WO 99/63941, pode ser usada no MEFAs. Se desejado, pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou mais epítopes da poliproteína do HCV podem ocorrer na proteína de fusão.

Por exemplo, epítopes derivados de, *e.g.* região hipervariável do E2; tal como uma região com amino ácidos 384-410 ou 390-410, podem ser incluídos no antígeno MEFA. Um epítope E2 particularmente eficaz é um que inclui uma seqüência de consenso desta região, tal como a seqüência de consenso Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn, que representa uma

seqüência de consenso para os amino ácidos 390-410 do genoma do HCV tipo 1. Um epítope E2 representativo em um MEFA da invenção pode compreender um epítope híbrido nos amino ácidos 390-444. Um tal epítope híbrido E2 pode incluir uma seqüência de consenso representando os amino ácidos 390-410 fundidos à seqüência de amino ácidos nativa para os amino ácidos 411-444 do HCV E2.

Adicionalmente, os antígenos podem ser derivados de várias linhagens de HCV. Linhagens virais múltiplas do HCV são conhecidas, e epítopes derivados de quaisquer dessas linhagens podem ser usadas em uma proteína de fusão. É bem conhecido que qualquer dada espécie de organismo varia de um organismo individual a um outro e ainda que um dado organismo tal como um vírus pode ter várias diferentes linhagens. Por exemplo, como explicado acima, o HCV inclui pelo menos 6 genótipos. cada um desse genótipos inclui determinantes antigênicos equivalentes. Mais especificamente, cada linhagem inclui vários determinantes antigênicos que estão presentes em todas as linhagens do vírus mas são ligeiramente diferentes de uma linhagem viral de uma outra. por exemplo, o HCV inclui o determinante antigênico conhecido como 5-1-1 (veja, Figura 1). Este determinante antigênico particular aparece em três formas nas três linhagens virais diferentes do HCV. Desse modo, em uma realização preferida da invenção todas as três formas do 5-1-1 aparecem no antígeno de fusão de epítope múltiplo usado nos imunoensaios. Similarmente, determinantes antigênicos equivalentes da região do núcleo de diferentes linhagens do HCV podem também estar presentes. Em geral, determinantes antigênicos equivalentes têm um alto grau de

homologia em termos de seqüência de amino ácido cujo grau de homologia é geralmente 30% ou mais, preferencialmente 40% ou mais, quando alinhado. O epítope de cópia múltiplo da presente invenção pode também incluir múltiplas cópias que são exatas cópias do mesmo epítope.

MEFAs representativos para uso com o presentes ensaios são descritos na Publicação Internacional WO 97/44469. MEFAs representativos adicionais para uso aqui incluem aqueles denominados MEFA 12, MEFA 13, e MEFA 13.1. è para ser entendido que esses MEFAs são meramente representativos e outros epítopes derivados do genoma do HCV também encontrarão uso com os presentes ensaios e podem ser incorporados nesses e em outros MEFAs.

A seqüência de DNA e seqüência de amino ácidos correspondente do MEFA 12 é mostrada na Figura 7a a 7F. A fórmula de estrutura geral para MEFA 12 é mostrada na Figura 6 e é como se segue; hSOD-E1 (tipo 1)-E2 HVR consenso (tipo 1a)-E2 HVR consenso (tipos 1 e 2)-c33c curta (tipo 1)-5-1-1(tipo 1)-5-1-1-(tipo 3)-5-1-1- (tipo-2)-c100 (tipo 1)-NS5 (tipo 1)-NS5 (tipo 1)-núcleo (tipos 1+2)-núcleo (tipos 1+2). Este epítope de cópia múltipla inclui a seguinte seqüência de amino ácido, numerada em relação ao HCV-1 (a numeração dos amino ácidos descrita abaixo segue a numeração de designação fornecida em Choo et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88: 2451-2455, em que o amino ácido #1 é a primeira metionina codificada pela seqüência codificadora da região de núcleo): os amino ácidos 1-69 de superóxido dismutase (SOD, usada para melhorar a expressão recombinante da proteína); os amino ácidos 303 a 320 da poliproteína da região E1; os amino ácidos 390 a 410 da

poliproteína representando uma seqüência de consenso para a região hipervariável do HCV-1a E2; os amino ácidos 384 a 414 da poliproteína da região E2, representando uma seqüência de consenso para as regiões hipervariáveis E2 do HCV-1 e HCV-2; os amino ácidos 1211-1457 da poliproteína do HCV1 que define a helicase; três cópias de um epítope de 5-1-1, amino ácidos 1689-1735, um de HCV1, um de HCV-3 e um de HCV-2, cujas cópias são determinantes antigênicos equivalentes das três linhagens virais diferentes de HCV; polipeptídeo do HCV C100 do HCV1, amino ácidos 1901-1936 da poliproteína; duas cópias exatas de um epítope da região NS5 do HCV1, cada um com amino ácidos 2278 a 2313 da poliproteína do HCV; e duas cópias das três epítopes da região do núcleo, duas do HCV1 e um do HCV1, cujas cópias são determinantes antigênicos equivalentes representados por amino ácidos 9 a 53 e 64-68 do HCV-1 e 67-84 do HCV-2.

A tabela 2 mostra as posições dos amino ácidos dos vários epítopes em MEFA 12 com referência às Figuras 7A a 7F. A numeração nas tabelas é relativa ao HCV1. Veja, Choo et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88: 2451-2455. MEFAs 13 e 13.1 também dividem a fórmula geral especificada acima para MEFA12, com modificações como indicado nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 2. MEFA 12

Mefa aa#	Fim de sitio 5'	Epítope	Hcv aa#	Linhagem
1-69	Nco1	hSOD		
72-89	Mlu	E1	303-320	1
92-112	Hind111	E2 HVR1a consenso	390-410	1
113-143		E2 HVR1+2 consenso	384-414	1,2

146-392	SpeI	C33C curto	1211-1457	1
395-441	SphI	5-1-1	1689-1735	1
444-490	NruI	5-1-1	1689-1735	3
493-539	ClaI	5-1-1	1689-1735	2
542-577	AvaI	C100	1901-1936	1
580-615	XbaI	NS5	2278-2313	1
618-653	BglII	NS5	2278-2313	1
654-741	NcoI	Núcleo Epítope	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 1
742-829	BalI	Núcleo Epítope	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

* A proteína de SOD é truncada de tal modo que o conjugado de detecção, um anticorpo anti-SOD marcado com HRP não se aglutine ao META. O epítope núcleo é mutado para prevenir os anticorpos ao núcleo do HCV, usado na detecção, da aglutinação ao MEFA.

Tabela 3. MEFA 13

Mefa aa#	Fim de sitio 5'	Epítope	Hcv aa#	Linhagem
1-159	Nco1	HSOD mutado (aa 70-72, ALA)		
161-178	Mlu	E1	303-320	1
181-201	Hind111	E2 HVR1a consenso	390-410	1
202-232		E2 HVR1+2 consenso	384-414	1,2
235-451		C33C curto	1211-1457	1
454-500	Hind III	5-1-1 PImut	1689-1735	1
503-549	NruI	5-1-1 PImut	1689-1735	3

552-598	ClaI	5-1-1 PImut	1689-1735	2
601-636	AvaI	C100	1901-1936	1
639-674	XbaI	NS5	2278-2313	1
677-712	BglII	NS5	2278-2313	1
713-800	NcoI	Núcleo Epítope	9-53, R47L	1
			64-88	1
			67-84	2
801-888	BalI	Núcleo Epítope	9-53, R47L	1
			64-88	1
			67-84	2

* Os epítopes 5-1-1 são modificados por eliminação de sítios de clivagem possíveis (CS ou CA) alvo pela proteína recombinante NS3/4a. Ao invés de CS ou CA, a seqüência foi variada para PI. Adicionalmente, a proteína de SOD é mutada de tal modo que o conjugado de detecção, um anticorpo anti-SOD marcado com HRP não se aglutina a MEFA. O epítope de núcleo é mutado para prevenir os anticorpos ao núcleo do HCV, usado na detecção, da aglutinação ao MEFA.

Tabela 4. MEFA 13.1

Mefa aa#	Fim de sitio 5'	Epítope	Hcv aa#	Linhagem
1-86	Nco1	HSOD mutado (aa 70-72, ALA)		
89-106	Mlu	E1	303-320	1
109-129	Hind111	E2 HVR1a consenso	390-410	1
130-160		E2 HVR1+2 consenso	384-414	1,2
163-379		C33C curto	1211-1457	1
382-428	Hind III	5-1-1 PImut	1689-1735	1
431-477	NruI	5-1-1 PImut	1689-1735	3
480-526	ClaI	5-1-1 PImut	1689-1735	2

529-564	AvaI	C100	1901-1936	1
567-602	XbaI	NS5	2278-2313	1
605-640	BglII	NS5	2278-2313	1
641-728		Núcleo Epítope	9-53, R47L	1
			64-88	1
			67-84	2
729-816		Núcleo Epítope	9-53, R47L	1
			64-88	1
			67-84	2

* Os epítopes 5-1-1 são modificados por eliminação de sítios de clivagem possíveis (CS ou CA) alvo pela proteína recombinante NS3/4a. Ao invés de CS ou CA, a seqüência foi variada para PI. Adicionalmente, a proteína de SOD é mutada de tal modo que o conjugado de detecção, um anticorpo anti-SOD marcado com HRP não se aglutina a MEFA. O epítope de núcleo é mutado para prevenir os anticorpos ao núcleo do HCV, usado na detecção, da aglutinação ao MEFA.

Em um formato de ensaio, a amostra é combinada com o suporte sólido como descrito adicionalmente abaixo. Se a amostra é infectada com HCV, antígenos núcleo, assim com anticorpos do HCV aqueles epítopes presentes no suporte sólido, se aglutinará aos componentes do suporte sólido, Um anticorpo anti-núcleo detectavelmente marcado é depois adicionado. O anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítope diferente do anticorpo anti-núcleo que é ligado ao suporte sólido, Este anticorpo anti-núcleo se aglutina ao anticorpo núcleo capturado pelos anticorpos anti-núcleo no suporte sólido.

Um anticorpo que reage com o anticorpo do HCV capturado da amostra biológica, que capturou o anticorpo do

HCV da amostra é reativo com o epítope do NS3/4a, é também adicionado. Este antígeno é preferencialmente um epítope derivado da região NS3 da poliproteína do HCV. Este antígeno se aglutina ao anticorpo do HCV capturado da amostra. Vários antígenos incluindo tais epítopes são conhecidos, incluindo, mas não limitado a, antígenos derivados das regiões c33c e c100, assim como proteínas de fusão compreendendo um epítope NS3, tal como c25. Esses e outros epítopes são úteis nos presentes ensaios e são conhecidos na técnica e descritos em, *e.g.*, Houghton et al., Patente US No. 5.350.671; Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA (1992) 89: 10011-10015; Chien et al., *J. Gastroent. Hepatol.* (1993) 8: S33-39; Chien et al., Publicação Internacional No. WO 93/00365; Chien, D.Y. Publicação Internacional No. WO 94/01778; e comumente cedida, Patente US No. 08/403.590 e 08/444.818.

Um segundo anticorpo direcionado contra o anticorpo antígeno descrito acima, é adicionado. Este anticorpo pode ser direcionado contra qualquer epítope incluído no antígeno. Por exemplo, o anticorpo pode ser direcionado contra a região NS3 presente no antígeno. Alternativamente, se o antígeno acima é expresso como uma proteína de fusão o segundo anticorpo marcado pode ser direcionado contra a parceiro de fusão. antígenos adicionais e anticorpos podem ser adicionados ao ensaio, particularmente se o suporte sólido inclui um MEFA. Esses formatos de ensaio são explicados adicionalmente abaixo.

Um ensaio representativo segundo a invenção é descrito na Figura 2. Como mostrado na Figura, o suporte sólido inclui dois anticorpos monoclonais anti-núcleo,

denominados c11-3 e c11-7. Esses anticorpo são direcionados contra um epítope encontrado na região com N terminal da proteína núcleo nos amino ácidos 10-53, numerado em relação a seqüência de poliproteína do HCV1. O suporte sólido também inclui um epítope para NS3/4a. A amostra biológica é adicionada ao suporte sólido. O antígeno núcleo do HCV, assim como anticorpos direcionados contra o epítope NS3/4a, ambos presentes na amostra, se aglutinarão aos reagentes de captura no suporte sólido.

Anticorpo monoclonal anti-núcleo marcado com HRP de Rábano peroxidasec11-14, direcionado contra a região com C terminal do núcleo encontrado nas posições de amino ácidos 120-130, numerados em relação a seqüência de poliproteína do HCV1, é depois adicionado. Uma proteína de fusão, compreendendo uma seqüência de SOD humano (hSOD) e um epítope da região c33c é adicionado, como é um segundo anticorpo marcado com HRP, direcionado contra a porção do SOD da proteína de fusão. A fusão SOD-c33 se aglutinará ao anticorpo anti-NS3 e o anticorpo SOD irá, por sua vez, se aglutinar a proteína de fusão SOD-c33. Detecção da marca indica a presença da infecção do HCV.

Um outro ensaio representativo segundo a invenção é descrito na Figura 8. A configuração de ensaio do anticorpo é um ensaio de captura em sanduíche antígeno-anticorpo-antígeno usando NS3/4a e MEFA 12. O suporte sólido inclui os dois anticorpos monoclonais descritos acima, um epítope ao NS3/4a, assim como um MEFA, MEFA 12 representativos, que inclui uma versão truncada do SOD humano. Como com o ensaio acima, a amostra biológica é adicionada ao suporte sólido. O antígeno do núcleo do HCV, assim como anticorpos

direcionados contra o epítope NS3/4a e epítopes do MEFA, presente na amostra, se aglutinará aos reagentes de captura no suporte sólido. Dois antígenos, um reativo com anticorpos da amostra que aglutinam NS3/4a 9como descrito acima) e um reativo com anticorpos da amostra que aglutinam MEFA 12, são adicionados. Na Figura 8, o antígeno reativo com o complexo do anticorpo da amostra / MEFA 12 é uma fusão entre uma molécula de SOD e c22ks delta47-L44W. O antígeno c22ks é da região do núcleo e inclui os amino ácidos Lys_{10} a Ser_{99}, assim como uma deleção de Arg_{47} normalmente presente e uma substituição de Leu por Trp na posição 44. O conjugado de detecção do anticorpo é o segundo anticorpo anti-SOD monoclonal marcado com HRP, descrito acima.

Os ensaios de combinação do antígeno/anticorpo descrito acima são particularmente vantajosos tanto no antígeno núcleo do HCV quanto anticorpos a NS3/4a e/ou núcleo podem ser detectados pelo mesmo suporte no mesmo ensaio. Além do mais, como descrito acima, epítopes do HCV adicionais, tal como fundido com SOD a c100, 5-1-1, antígenos NS5, assim como uma proteína resultante de um quadro de deslocamento na região do núcleo da poliproteína, tal como descrito na Publicação Internacional No. WO 99/63941, podem ser usados no coquetel de combinação para cobrir outros epítopes não estruturais do HCV.

A fim de adicionalmente entender a invenção, uma discussão mais detalhada é fornecida abaixo com relação a produção de anticorpos para uso nos imunoensaios; produção de polipeptídeos para uso nos imunoensaios; e métodos de condução dos imunoensaios.

Produção de anticorpos para uso nos imunoensaios com HCV

Como explicado acima, o ensaio utiliza vários anticorpos que são ligados a um suporte sólido (*e.g.*, um ou mais anticorpos anti-núcleo), ~~e que detectam complexos de~~ antígeno/anticorpo formados quando a infecção por HCV está presente na amostra. Esses anticorpos podem ser preparações de anticorpos monoclonais ou policlonais, antisoro monoespecífico, anticorpos humanos, ou podem ser anticorpos híbridos ou quiméricos, tal como anticorpos humanizados, anticorpos alterados, fragmentos $F(ab')_2$ e F(ab) e Fv, anticorpos de domínio único, construções de fragmento de anticorpo dimérico ou trimérico, minicorpos, ou fragmentos funcionais dos mesmos que se aglutinam ao antígeno em questão.

Anticorpos são produzidos usando técnicas bem conhecidas daqueles técnicos no assunto e descritos, em, por exemplo, Patente US No. 4.011.308; 4.722.890; 4.016.043; 3.876.504; 3.770.380; 4.372.745. Por exemplo, anticorpos policlonais são gerados por imunização de um animal adequado tal como um camundongo, rato, coelho, carneiro ou cabra, com um antígeno de interesse. A fim de aumentar a imunogenicidade, o antígeno pode ser ligado a um suporte antes da imunização. Tais suportes são bem conhecidos do técnico no assunto. Imunização é geralmente préformada pela mistura ou emulsificação do antígeno na salina, preferencialmente em um adjuvante tal como adjuvantes completo de Freund, e injeção da mistura ou emulsão parenteralmente (geralmente subcutaneamente ou intramuscularmente). O animal é geralmente boosted 2-6

semanas após com uma ou mais injeções do antígeno em salina, preferencialmente usando um adjuvante incompleto de Freund. Anticorpos podem também ser gerados por imunização in vitro, usando métodos conhecidos na técnica. Antisoro policlonal é depois obtido do animal imunizado. Veja, *e.g.*, Houghton et al., Patente US No. 5.350.671, para a descrição da produção de anticorpos policlonais anti-HCV.

Anticorpos monoclonal são geralmente preparados usando o método de Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497, ou uma modificação do mesmo. Tipicamente, um camundongo ou rato é imunizado como descrito acima. Entretanto, ao invés de sangramento do animal para extrair soro, o baço (e opcionalmente vários nódulos do linfo grandes) é removido e dissociado em células únicas. Se desejado, as células do baço podem ser selecionadas (após remoção de células aderentes não especificamente) pela aplicação de uma suspensão de célula a uma placa ou cavidade revestida com o antígeno. Células B, expressando imunoglobulina ligada com membrana específica para o antígeno, irá aglutinar-se à placa, e não serão rinsadas com o resto da suspensão. Células B resultantes, ou todas as células do baço dissociadas, são depois induzidas para fundir com células do mieloma para formar hibridomas, e são cultivadas em um meio seletivo (*e.g.*, meio de hipoxantina, aminopterina, timidina, "HAT"). Os hibridomas resultantes são colocados em placa pela limitação de diluição, e são submetidas a ensaio para a produção de anticorpos que se aglutinam especificamente ao antígeno imunizante (e que não se aglutinam e então se aglutinam a uns não relacionados). Os hibridomas que secretam anticorpo monoclonal

selecionados são depois cultivados in vitro (*e.g.*, em garrafas de cultura de tecido ou reatores de fibra oca), ou in vivo (*e.g.*, como áscitos em camundongos).

A produção de vários anticorpos monoclonais foram descritos, *e.g.*, Houghton et al., Patente US No. 5.350.671; Chien et al., Publicação Internacional No. WO 93/00365; comumente cedida, Patente US No. 08/403.590 e 08/444.818.; e Kashiwakuma et al., Patente US No. 5.871.904.

Como explicado acima, fragmentos de anticorpo que retêm a capacidade de reconhecer o antígeno de interesse, irá também encontrar uso no imunoensaio. Vários fragmentos de anticorpo são conhecidos na técnica os quais compreendem sítios de aglutinação de antígeno capazes de apresentar propriedades de aglutinação imunológica de uma molécula de anticorpo intacta. Por exemplo, fragmentos de anticorpo funcionais podem ser produzidos por clivagem de uma região constante, não responsável por aglutinação de antígeno, da molécula de anticorpo, usando *e.g.*, pepsina, para produzir fragmentos $F(ab')_2$. Esses fragmentos conterão dois sítios de aglutinação, mas não terão uma porção da região constante de cada uma das cadeias pesadas. Similarmente, se desejado, fragmentos Fab, compreendendo um único sítio de aglutinação de antígeno, pode ser produzido, *e.g.*, por digestão de anticorpos monoclonais ou policlonais com papaína. Fragmentos funcionais, incluindo somente as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas, podem também ser produzidas, usando técnicas padrão tal como produção recombinante ou clivagem proteolítica preferencial de moléculas de imunoglobulina. Esses fragmentos são conhecidos como F_v. Veja, *e.g.*, Inbar et al. (1972) *Proc.*

Nat. Acad. Sci. USA 69: 2659-2662; Hochman et al. (1976) *Biochem* 15: 2706-2710; e Ehrlich et al. (1980) *Biochem* 19: 4091-4096.

Um polipeptídeo de cadeia única Fv ("sFv" ou "scFv") é um heterodímero V_H-V_L ligado covalentemente que é expresso de uma fusão de gene incluindo genes codificadores de V_H e V_L ligados por um ligante codificador de peptídeo. Histon et al. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883. Vários métodos foram descritos para discernir e desenvolver estruturas químicas (ligantes) para converter cadeias de polipeptídeo leves e pesadas, naturalmente agregadas, mas quimicamente separadas de uma região de anticorpo V em uma molécula sFv que dobrará em uma estrutura tridimensional substancialmente similar à estrutura de um sítio de aglutinação de antígeno. Veja, Patente US No. 5.091.513, 5.132.405, e 4.946.778. As moléculas de sFv podem ser produzidas usando métodos descritos na técnica. Veja, *e.g.*, Huston et al., (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA 85: 5879-5883; Patente US No. 5.091.513, 5.132.405 e 4.946.778. Critério de design incluem determinação do comprimento apropriado para alcançar a distância entre o C terminal de uma cadeia e o N terminal de outro, em que o ligante é geralmente formado de resíduos de amino ácidos pequenos hidrofílicos que não tendem a espiralar ou formar estruturas secundárias. Tais métodos foram descritos na técnica. Veja, Patente US No. 5.091.513, 5.132.405 e 4.946.778. Ligantes adequados geralmente compreendem cadeias de polipeptídeo de conjuntos alternados de resíduos de glicina e serina, e podem incluir resíduos de ácido glutâmico e lisina inseridos para

aumentar solubilidade.

"Mini-anticorpos" ou "minicorpos" encontrarão uso com a presente invenção. Minicorpos são cadeias de polipeptídeo sFv que incluem domínios de oligomerização no seu C terminal, separado do sFv por uma região de dobra. Pack et al. (1992) *Biochem* 31: 1579-1584. O domínio de oligomerização compreende auto-associação de α-hélices, *e.g.*, zíperes de leucina, que podem ser adicionalmente estabilizados por ligações dissulfeto adicionais. O domínio de oligomerização é designado por ser compatível com dobra de vetor através de uma membrana, um processo pensado por facilitar a dobra in vivo do polipeptídeo em uma proteína aglutinante funcional. Geralmente, minicorpos são produzidos usando métodos recombinantes bem conhecidos na técnica. Veja, *e.g.*, Pack et al., (1992) *Biochem* 31: 1579-1584; Cumber et al. (1992) *J Immunology* 149B: 120-126.

Produção de antígenos para uso nos imunoensaios do HCV

Como explicado acima, as moléculas da presente invenção são geralmente produzidas recombinantemente. Assim, polinucleotídeos codificando antígenos do HCV para uso com a presente invenção podem ser feitos usando técnicas padrão de biologia molecular. Por exemplo, seqüências de polinucleotídeo codificando as moléculas descritas acima podem ser obtidas usando métodos recombinantes, tal como por cDNA de seleção e bibliotecas genômicas de células expressando o gene, ou por derivação de um gene de um vetor conhecido para incluir o mesmo. Além do mais, o gene desejado pode ser isolado diretamente de moléculas de ácido nucléico viral, usando técnicas

descritas na técnica, tal como em Houghton et al., Patente US No. 5.350.671. O gene de interesse pode também ser produzido sinteticamente, ao invés de clonado. As moléculas podem ser designadas com códons apropriados para a seqüência particular. A seqüência completa é depois montada a partir de sobreposição de oligonucleotídeos preparados por métodos padrão e montadas em uma seqüência codificadora completa. Veja, *e.g.*, Edge (1981) *Nature* 292: 756; Nambair et al. (1984) *Science* 223: 1299; e Jay et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 6311.

Assim, as seqüências particulares podem ser obtidas de vetores aportando as seqüências desejadas ou complemente sintetizadas ou em parte usando várias técnicas de síntese de oligonucleotídeo conhecidas na técnica, tal como mutagênese direcionada a sítio e reação de cadeia polimerase (PCR) onde apropriado. Veja, *e.g.*, Sambrook, *supra*. Em particular, um método de obtenção de seqüências de nucleotídeo codificando as seqüências desejadas é por cozimento de conjuntos complementares de oligonucleotídeos sintéticos de sobreposição produzidos em um sintetizador convencional, automatizado, seguido por ligação com uma ligase de DNA apropriada e amplificação da seqüência de nucleotídeo ligado via PVR. Veja, *e.g.*, Jayaraman et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88: 4084-4088. Adicionalmente, síntese direcionada de oligonucleotídeo (Jones et al., (1986) *Nature* 54: 75-82), mutagênese direcionada de oligonucleotídeo de regiões de nucleotídeo pré-existentes (Riechmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-327 e Berhoenyen et al. (1988) *Science* 239: 1534-1536), e carregamento enzimático de oligonucleotídeos com intervalo

usando polimerase de DNA T_4 (Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 86: 10029-10033) podem ser usados segundo a invenção para fornecer moléculas tendo capacidades de aglutinação de antígeno melhoradas ou alteradas, e/ou imunogenicidade reduzida.

Uma vez que seqüências codificadoras tenham sido preparadas ou isoladas, tais seqüências podem ser clonadas em qualquer vetor ou replicon. Numerosos vetores de clonagem são conhecidos pelos técnico no assunto, e a seleção de um vetor de clonagem apropriado é uma matéria de escolha. Vetores adequados incluem, mas não estão limitados a, plasmídios, fagos, tranposons, cosmídios, cromossomos ou vírus que são capazes de replicação quando associados com os próprios elementos de controle.

A seqüência codificadora é depois colocada sob o controle de elementos de controle adequados, dependendo do sistema a ser usado para expressão. Assim, a seqüência codificadora pode ser colocada sob o controle de um promotor, sítio de aglutinação de ribossoma (para expressão bacteriana), e opcionalmente, um operador, de tal modo que a seqüência de DNA de interesse seja transcrito em RNA por um transformante adequado. A seqüência codificadora pode ou pode não conter um peptídeo sinal ou seqüência líder que pode depois ser removida pelo hospedeiro no processamento de pós-tradução. Veja, *e.g.*, Patente US No. 4.431.739, 4.425.437; 4.338.397.

Além das seqüências de controle, pode ser desejável adicionar seqüências reguladoras que permitam a regulação da expressão das seqüências relativas ao crescimento da célula hospedeira. Seqüências reguladoras são conhecidas

daqueles técnicos no assunto, e exemplos incluem aqueles que causam a expressão de um gene a ser ligado ou desligado em resposta a um estímulo químico ou físico, incluindo a presença de um composto regulador. Outros tipos de elementos reguladores podem estar também presentes no vetor. Por exemplo, elementos amplificadores podem ser usados para aumentar níveis de expressão das construções. Exemplos incluem o amplificador de gene anterior SV40 (Dijikema et al. (1985) EMBO J. 4:761), o amplificador/promotor derivado da repetição terminal comprida (LTR) do vírus Rous Sarcoma (Gorman et al. (1982) *Poc. Natl. Acad. Sci.* USA 79: 6777) e elementos derivados de CMV humano (Boshart et al., (1985) *Cell* 41: 521), tais como elementos incluídos na seqüência de íntron A do CMV (Patente US No. 5.688.688). O cassete de expressão pode adicionalmente incluir uma origem de replicação para replicação autônoma em uma célula hospedeira adequada, um ou mais marcadores selecionáveis, um ou mais sítios de restrição, um potencial para alto número de cópias e um forte promotor.

Um vetor de expressão é construído de tal modo que a seqüência codificadora particular é localizada no vetor com as seqüências reguladoras apropriadas, o posicionamento e orientação da seqüência codificadora com relação às seqüências de controle sendo de tal modo que a ser codificadora é transcrita sob o "controle" das seqüências de controle (i.e., RNA polimerase que se aglutina à molécula de DNA nas seqüências de controle (i.e., RNA polimerase que se aglutina à molécula de DNA nas seqüências de controle transcreve a seqüência codificadora).

Modificação das seqüências codificadoras da molécula de interesse pode ser desejável para alcançar este fim. Por exemplo, em alguns casos pode ser necessário modificar a seqüência de tal modo que possa ser ligada a seqüências de controle na orientação apropriada, i.e. para manter o quadro de leitura. As seqüências de controle e outras seqüências reguladoras podem ser ligadas à seqüência codificadora antes da inserção no vetor. Alternativamente, a seqüência codificadora pode ser clonada diretamente em um vetor de expressão que já contenha as seqüências de controle e um sítio de restrição apropriado.

Como explicado anteriormente, pode também ser desejável produzir mutantes ou análogos do antígeno de interesse. isto é particularmente verdadeiro com NS3/4a. Métodos para fazê-lo são descritos em, *e.g.*, Dasmahapatra et al., Dasmahapatra et al., Patente US No. 5.843.752 e Zhang et al., Patente US No. 5.990.276. Mutantes ou análogos deste e outras proteínas do HCV para uso nos ensaios podem ser preparados pela deleção de uma porção da seqüência codificadora do polipeptídeo de interesse, pela inserção de uma seqüência, e/ou por substituição de um ou mais nucleotídeos dentro da seqüência. Técnicas para modificar seqüências de nucleotídeo, tal como mutagênese direcionada a sítio, e similares, são bem conhecidos daqueles técnicos no assunto. Veja, *e.g.*, Sambrook et al., supra; Kunkel T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA (1985) 82: 448; Geisselsoder et al. (1987) *BioTechniques* 5: 786; Zoller and Smith (1983) *Methods Enzymol.* 100: 468; Dalbie-McFarland et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6409.

As moléculas podem ser expressas em uma ampla variedade de sistemas, incluindo inseto mamíferos, bactérias, sistemas de expressão viral, e de levedura, todos bem conhecidos na técnica.

Por exemplo, sistemas de expressão de célula de inseto, tais como baculovírus, são conhecidos daqueles técnicos no assunto e descritos em, *e.g.*, Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.* 1555 (1987). Materiais e métodos para sistemas de expressão de célula de baculovírus e célula de inseto são comercialmente disponíveis na forma de kit, e inter alia, Invitrogen, San Diego CA (kit "maxBac"). Similarmente, sistemas de expressão de mamífero e bacteriano são bem conhecidos na técnica e descritos, em *e.g.*, Sambrook et al., supra. Sistema de expressão de levedura são também conhecidos na técnica e descritos em, *e.g.*, *Yeast Genetic Engineering* (Barr et al., eds., 1989) Butterorths, London.

Várias células hospedeiras apropriadas para uso com os sistemas acima são também conhecidos. Por exemplo, linhagens de células de mamífero são conhecidas na técnica e incluem linhagens de célula imortalizadas disponíveis junto a American Type Culture Collection (ATCC), tal como, mas não limitado a, ovários de hasmter Chinês, células HeLa, células do rim de hamster filhote (BHK), células de rim embriônico humano, células de carcinoma heptacelular (*e.g.*, Hep (G2), células do rim de bovino Madin-Barby ("MDBK"), assim como outros. Similarmente, hospedeiros bacterianos tais como *E. coli, Bacillus subtilis,* e *Styreoptacoccus spp.* Células de levedura úteis na presente invenção incluem inter alia , *Saccharomyces cerevisae,*

Candida albicans, Candida maltosa, Hansenula polymorpha, Kluveromyces fragilis, Kluveromyces lactis, Pichia guillerimondii, Pichia pastoris, Scharomyces cerevisae e *Yarrowia lipojlitica.* Células de inseto para uso com vetores de expressão de baculovírus incluem, inter alia, *Aedes aegypit, Autographa californica, Bombyx mori, Drosophila melanogaster, Spodoptera frugiperda, e Trichoplusia ni.*

Molécula de ácido nucléico compreendendo seqüências de nucleotídeo de interesse que podem ser estavelmente integrados em um genoma de célula hospedeira ou mantidas em um elemento episssomal estável em uma célula hospedeira usando várias técnicas de liberação de gene bem conhecidas na técnica. Veja, *e.g.*, Patente US No. 5.399.346.

Dependendo do sistema de expressão e hospedeiro selecionados, as moléculas são produzidas pelo crescimento de células hospedeiras transformadas por um vetor de expressão descrito acima sob condições por meio das quais a proteína é expressada. A proteína expressada é depois isolada das células hospedeiras e purificadas. SE o sistema de expressão secreta a proteína no meio de crescimento, o produto pode ser purificado diretamente do meio. Se não é secretado, ele pode ser isolado dos lisatos de células. A seleção das condições de crescimento apropriado e métodos de recuperação estão dentro do estado da técnica.

Produção recombinante de vários antígenos do HCV foram descritos. Veja, *e.g.*, Houghton et al., Patente US No. 5.350.671; Chien et al., *J. Gastroent. Hepatol.* (1993) 8: S33-39; Chien et al. Publicação Internacional No. WO 93/00365; Chien D. Y., Publicação Internacional WO

94/01778.

Ensaios de imunodiagnóstico

Uma vez produzidos, anticorpos anti-núcleo e antígenos NS3/4a são colocados em um suporte sólido apropriado para uso nos imunoensaios. Um suporte sólido, para os fins desta invenção, podem ser qualquer material que é uma matriz insolúvel e pode ter uma superfície rígida ou semi-rígida. Suportes sólidos exemplares incluem, mas não estão limitados a, substratos tal como nitrocelulose (*e.g.*, em forma de membrana ou microtítulo); policloreto de vinila (*e.g.*, folhas ou cavidades de microtitulação); látex de poliestireno (*e.g.*, contas ou placa de microtitulação), polifluoreto de vinilideno; papel diazotado, membranas de nylon; contas ativadas, contas de resposta magnética, e similares. Suportes particulares incluem placas, pelotas, discos, capilares, fibras ocas, agulhas, pinos, fibras sólidas, contas de celulose, contas de vidro de núcleo, géis de sílica, contas de poliestireno opcionalmente reticulados com divinilbenzeno, enxertado com contas co-poli, contas de poliacrilamida, contas de látex, contas de dimetilacrilamida opcionalmente reticuladas com N-N´-bis-acriloiletilenodiamina, e partículas de vidro revestidas com um polímero hidrofóbico.

Se desejado, as moléculas a serem adicionadas ao suporte sólido podem prontamente ser funcionalizadas para criar porções de estireno e acrilato, permitindo assim a incorporação das moléculas em poliestireno, poliacrilato ou outros polímeros tais como poliimida, poliacrilamida, polietileno, polivinila, polidiacetileno, polifenileno-vinileno, polipeptídeo, polisacarídeo, polisulfona,

polipirrol, poliimidazol, politiofeno, poliéter, epóxidos, vidro de sílica, sílica gel, polifosfato, hidrogel, agarose, celulose e similares.

Em um contexto, um suporte sólido é um primeiro reagido com os anticorpos anti-núcleo do HCV e epítope NS3/4a (coletivamente chamado de "componentes de fase sólida" aqui), e opcionalmente um ou mais MEFAs, sob condições aglutinantes adequadas de tal modo que as moléculas sejam suficientemente imobilizadas ao suporte. às vezes, a imobilização para o suporte pode ser amplificada pelo primeiro acoplamento do antígeno e/ou anticorpo a uma proteína com melhores propriedades de aglutinação de fase sólida. Proteínas de acoplamento adequadas incluem, mas não estão limitadas a macromoléculas tal como albuminas do soro incluindo albumina do soro bovino (BSA), hemocianina de lapa, moléculas de imunoglobulina, tiroglobulina, ovalbumina, e outras proteínas bem conhecidas daqueles técnicos no assunto. Outros reagentes que podem ser usados para aglutinar moléculas ao suporte incluem polissacarídeos, ácidos poliláticos, ácidos poliglicólicos, amino ácido poliméricos, copolímeros de amino ácidos e similares. Tais moléculas e métodos de acoplamento dessas moléculas a antígeno, são bem conhecidas dos técnicos no assunto. Veja, *e.g.*, M.A. (1992) *Bioconjugate Chem,*. 3: 2-13; Hashida et al. (1994) *J. Appl. Biochem.* 6: 56-63; e Anjaneyulu and Staros (1987) *International J. of Peptide and Protein Res.* 30: 117-124.

Após reação do suporte sólido com os componentes em fase sólida, quaisquer componentes de fase sólida são removidos do suporte por lavagem, e os componentes ligados

com suporte são depois colocados em contato com uma amostra biológica suspeita de conter anticorpos e antígenos do HCV (coletivamente chamados de "moléculas ligantes") sob condições de aglutinação adequadas. Após lavagem para remover quaisquer outras moléculas ligantes, um segundo anticorpo, direcionado contra um epítope diferente daquele anticorpo do núcleo ligado ao suporte, é adicionado sob condições de aglutinação adequadas. O anticorpo anti-núcleo adicionado inclui uma marca detectável, como descrito acima, e age para aglutinar qualquer antígeno núcleo que possa estar presente na amostra que tenha reagido com o anticorpo anti-núcleo ligado ao suporte. Também adicionado estão um ou mais antígenos que podem reagir com anticorpos presentes na amostra que tenham, por sua vez, reagido com o epítope NS3/4a. Como explicado acima, o antígeno é tipicamente derivado da região NS3 da poliproteína do HCV, e particularmente da região c33c do HCV. Veja, Houghton et al., Patente US No. 5.350.671; Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989) 89: 10011-10015; Publicação Internacional No. WO 93/00365; e comumente cedida e deferida Patente US No. 08/403.590 e 08/444.818, para uma descrição desta região e epítopes derivados dos mesmos. Um anticorpo marcado contra este antígeno é também adicionado. O anticorpo consequentemente se aglutinará ao antígeno, que reagiu com anticorpos anti-NS3 presentes na amostra. Para este fim, o epítope c33c pode ser convenientemente fornecido como uma fusão entre c33c e superóxido de dismutase humana (hSOD), produzido recombinantemente por métodos descritos em Houghton et al., Patente US No. 5.350.671. As seqüências de nucleotídeo e amino ácido para

SOD humana são conhecidas e reportadas em Hallewell et al., Patente US No. 5.710.033. Um anticorpo marcado direcionado contra SOD humano pode consequentemente ser usado para detectar a presença de complexos formados entre o epítope NS3/4a, quaisquer anticorpo na amostra que reage com este epítope, e polipeptídeos do HCV que por sua vez se aglutinam ao anticorpo da amostra.

SE um MEFA está presente no suporte sólido, um ou mais antígenos, reativos com anticorpos da amostra biológica que são ligados a antígenos presentes no MEFA, podem também ser adicionados ao ensaio. Particularmente útil neste contexto está um antígeno derivado da região do núcleo do HCV, e mais particularmente, do antígeno c22 que inclui amino ácidos de núcleo com N terminal da poliproteína do HCV. Um antígeno particular derivado de c22 é c22ks delta47-L44W que inclui amino ácidos Lys_{10} a Ser_{99} da poliproteína, assim como a deleção de Arg_{47} normalmente presente e uma substituição de Leu por Trp na posição 44. Como com o epítope c33c descrito acima, este antígeno pode ser fornecido como uma fusão com hSOD e o mesmo anticorpo marcado, direcionado contra SOD humano, pode ser usado para detectar a presença de complexos formados entre anticorpos presentes na amostra e o epítope NS3/4a e/ou MEFA, cujos complexos são também ligados com os antígenos do HCV (*e.g.*, c33c e c22).

mais particularmente, um método ELISA pode ser usado, em que as paredes de uma placa de microtítulo são revestidas com os componentes em fase sólida. Uma amostra biológica contendo ou suspeita de conter moléculas de ligante é depois adicionada às cavidades revestidas. Após

um período de incubação insuficiente para deixar molécula ligante aglutinar-se ao componente de fase sólida imobilizado, a placa(s) pode ser lavada para remover porções não ligadas e uma molécula aglutinante secundária detectavelmente marcada (anticorpo anti-núcleo marcado), uma molécula contendo epítope NS3, e um anticorpo direcionado contra a molécula contendo epítope NS3 adicionada. Essas moléculas são deixadas reagir com qualquer anticorpo e antígeno da amostra capturados, a placa lavada e a presença dos anticorpos marcados detectados usando métodos bem conhecidos na técnica.

Os reagentes de ensaios descritos acima, incluindo suporte sólido de imunoensaio com anticorpos e antígenos aglutinados, assim como anticorpos e antígenos a serem reagidos com a amostra capturada, que pode ser fornecida em kits, com instruções adequadas e outros reagentes necessários, a fim de conduzir imunoensaios como descrito acima. O kit pode conter, dependendo do imunoensaio usado, marcas adequadas e outros reagentes e materiais embalados (i.e. tampões de lavagem e similares). Imunoensaios padrão, tais como aqueles descritos podem ser conduzidos usando esses kits.

III. Experimental

Abaixo são exemplos de realizações específicas para realizar a presente invenção. Os exemplos são apresentados para fins ilustrativos somente, e não são destinados a limitar o escopo da presente invenção de modo algum.

Esforços têm sido feitos para assegurar acurácia com relação a números usados (*e.g.*, quantidades, temperaturas, etc.), mas algum erro experimental e desvio devem, é claro,

ser considerados.

Exemplo 1

Imunoensaio de Combinação de Anticorpo/Antígeno do HCV

O presente imunoensaio de combinação de anticorpo/antígeno do HCV foi comparado a outros ensaios com HCV para testar os limites de detecção de soroconversão e comparar esses limites aqueles obtidos em outros ensaios comercialmente disponíveis como se segue.

A. Materiais e Métodos

Amostras de sangue: Painéis de amostras de sangue humano comercialmente disponíveis foram usados. Tais painéis está disponíveis, *e.g.*, junto a Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA (BBI); Bioclinical Partners, Franklin, MA (BCP); e North American Biologics, Inc., BocoRatan, FL (NABI). Os dias indicados nas Tabelas 5 e 6 são dias nos quais o sangue foi coletado dos indivíduos.

Anticorpos monoclonais: Anticorpos monoclonais c11-3, c11-7, e c11-14 foram obtidos junto a Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey. Os anticorpos c11-3 e c11-7 são direcionados contra uma porção com N terminal do núcleo (amino ácidos 10-53, numerados em relação a poliproteína do HCV1). O anticorpo monoclonal c11-14 é direcionado contra uma porção com C terminal do núcleo (amino ácidos 120-130, numerados em relação a poliproteína do HCV1). O anticorpo c11-14 foi conjugado a rábano-peroxidase (HRP) usando procedimentos padrão.

Anticorpo monoclonal 5A-3 é um anticorpo anti-SOD direcionado contra amino ácidos 1 a 65 de SOD e foi feito usando técnicas padrão. O anticorpo foi conjugado com HRP

como descrito acima.

B. Antígenos:

O antígeno c33c (266 amino ácidos, amino ácido 1192 a 1457 da poliproteína do HCV1) foi expresso como um polipeptídeo de fusão de SOD em *E. coli* por métodos descritos para a síntese do antígeno 5-1-1 (Choo, et al., *Science*, 91989) 244: 359-362). O antígeno recombinante foi purificado como descrito em Chien, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989) 89: 10011-10015. Veja, por exemplo, Houghton et al., Patente US No. 5.350.671, para produção de protocolos para SOD-c33c.

O epítope NS3/4a usado no ensaio é um epítope conformacional tendo a seqüência especificada na Figura 3.

C. Formatos do Imunoensaio:

O ensaio Abbott PRISM (Abbott Laboratories, Abbott Parl, IL), está comercialmente disponível e é um ensaio de detecção à base de anticorpo. O ensaio foi realizado usando as instruções do fabricante.

O ORTHO HCV Versão 3.0 ELISA Test System (denominado aqui de ensaio Ortho 3.0, Ortho Clinical Diagnostics, raritan, New Jersey) é um ensaio de detecção à base de anticorpo. O ensaio foi conduzido usando nas instruções de manufatura.

O ensaio Roche Amplicor (Roche, Pleasant, CA) é um ensaio à base de PCR comercialmente disponível. O ensaio foi realizado usando as instruções do fabricante.

O ensaio Gen-Probe TMA (San Diego, CA) é um ensaio de amplificação mediada por transcrição comercialmente disponível. O ensaio foi realizado usando as instruções do fabricante.

O ensaio de antígeno Ortho (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) é um ensaio de detecção à base de antígeno. O ensaio foi realizado usando as instruções do fabricante.

O imunoensaio de combinação de anticorpo/antígeno do HCV foi realizado como se segue. 4 mg/ml de anticorpos monoclonais purificados C11-7 e c-11-3 em solução salina tamponada com fosfato 1x (PBS), pH 7,4 foram combinados e bem misturados. 90 ng do antígeno recombinante NS3/4a foi adicionado ao mesmo tampão de revestimento. A solução foi misturada 30 minutos antes do revestimento. 200 ml da solução acima foram adicionados por cavidade a placas de microtitulação de aglutinação de meio Costar de 96 cavidades (Corning, Inc.). Placas foram incubadas a 15-30°C por 16-24 horas. Placas foram lavadas duas vezes com dH_2O, seguida com 300 µl/cavidade de tampão de pós revestimento (albumina de soro bovino 1% (BSA), 1 x PBS) por 1 hora e 300 µl/cavidade de tampão de estabilidade (1 x PBS, 1% BSA, manitol, polietileno glicol (PEG), gelatina) por 1 hora. Placas foram aspiradas e secas a 4°C em um liofilizador por 24 horas. Placas foram preenchidas com dessecante.

Para conduzir o imunoensaio de combinação de anticorpo/antígeno, 100 µl de tampão de lise melhorado (N-lauril sarcosina 1%, NaCl 0,65 M, 50 mg/ml de IgG de camundongo grau técnico (Sigma, St Louis, MO), BSA 1% modificado com sulfidrila (Bayer), Caseína 0,1%) foram adicionados à placa. 100 ml da amostra foram depois adicionados. Esta foi depois incubada em um agitador a 40°C por 1 hora. As placas foram lavadas seis vezes com 1 x PBS, Tween-20 0,1%, em um Ortho Plate Washer. 200 ml de solução

conjugada (diluição 1:75 c11-14-HRP com 250 ng/ensaio de antígeno SOD-c33c mais diluição 1:5000 de ani-SOD-HRP de camundongo em diluente de amostra HCV 3.0 (da ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System, Ortho Clinical Diagnostics, Rarita, New Jersey) sem extrato de SOD, todos preparados 30 minutos antes da adição). A solução foi incubada 45 minutos com agitação a 40°C. Esta foi lavada seis vezes, como acima, e 200 ml de solução de substrato (1 OPD tablete/10 ml) foi adicionada. O tablete OPD contém dicloridrato de o-fenilenodiamina e peróxido de hidrogênio para desenvolvimento de cor na reação com rábano peroxidase e está disponível junto a Sigma, St. Louis, MO. Esta foi incubada 30 minutos a 15-30°C no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50 ml de H_2SO_4 e as placas foram lidas a 492 nm, em relação a absorvância a 690 nm como controle.

D. Resultados:

os resultados dos vários ensaios são mostrados nas Tabelas 5 e 6, que descrevem dois experimentos separados feitos em amostras de sangue expostos a infecção como indicado. Áreas escurecidas indicam detecção de vírus. Como mostrado abaixo, ensaio de antígeno de combinação de Chrion detectou soroconversão em todas as amostras, enquanto todos os outros ensaios à base de antígeno falharam na detecção de soroconversão em pelo menos uma amostra. Em particular, nem os ensaios á base de anticorpo detectar a soroconversão até pelo menos o dia 18 (Tabela 5). A Tabela 6 mostra que nem os ensaios à base de anticorpo detectaram a presença de infecção com HCV no dia 22. Além do mais, o ensaio à base de antígeno Ortho falhou para detectar a soroconversão dos

85 dias.

Assim, baseado nos resultados acima, é claro que o novo ensaio de antígeno/anticorpo de combinação reduz o número de negativos falsos obtidos usando outros ensaios de antígeno/anticorpo convencionais.

Tabela 5

Soroconversão do HCV

DIAS	Abbott PRISM	Ortho 3.0	Roche Amplicor	Gen-Probe TMA	Ortho Ag	Chron Ag/Ab
0	0,1	0,0	>5 x 10^5	9,25	18,6	2,8
4	0,1	0,0	>5 x 10^5	9,29	19,0	3,1
7	0,1	0,0	>5 x 10^5	9,52	22,3	1,5
13	0,3	0,1	>5 x 10^5	9,59	26,2	1,7
18	1,3	0,4	>5 x 10^5	9,70	15,9	1,2
21	2,2	1,0	>5 x 10^5	9,39	11,3	1,5
164	4,2	4,4	4 x 10^4	9,28	0,11	2,5

Tabela 6

Soroconversão do HCV

DIAS	Abbott PRISM	Ortho 3.0	Roche Amplicor	Gen-Probe TMA	Ortho Ag	Chron Ag/Ab
0	0,1	0,0	BDL		0,11	0,5
13	0,1	0,0	>5 x 10^5		44,0	3,0
20	0,1	0,0	>5 x 10^5		24,2	1,3
22	0,3	0,0	>5 x 10^5		29,2	1,6
85	5,4	4,7	BQR		0,06	1,1
131	4,3	4,7	BQR		0,09	1,0
135	4,6	4,7	3 x 10^3		0,09	1,2
138	5,5	4,7	BDL		0,08	1,2
146	5,9	4,7	BDL		0,11	2,1

152	5,2	4,7	BQR		0,07	1,8

Exemplo 2

Produção de um epítope conformacional NS3/4a com substituições de Thr por Pro e Ser por Ile

Um epítope conformacional de NS3/4a foi obtido como se segue. Este epítope tem a seqüência especificada nas Figuras 4A a 4D e difere da seqüência nativa e forneceria um sítio de clonagem 5´HindIII, seguido pela seqüência ACAAAACAAA, o iniciador ATG, e códons para HCV1a, começando com o amino ácido 1027 e continuando para um sítio Bg/Ino amino ácido 1046; (b) um fragmento de restrição BglI-ClaI de 683 bp (codificando amino ácidos 1046-1274) de pAcHLTns3ns4aPI; e (c) um vetor pSP72 (Promega, Madison, WI, GenBankl/EMBL Número de Acesso X65332) que foi digerido com HindIII e ClaI, desfosforilado, e purificado com gel. O plasmídio pAcHLTns3ns4aPIfoi derivado de pAcHLT, um vetor de expressão de baculovírus comercialmente disponível junto a BD Pharmaingen (San Diego, CA). Em particular, um vetor de pAcHLY EcoRI-PstI foi preparado, assim como os seguintes fragmentos: EcoRI-AlwnI, 935 bp, correspondendo aos amino ácidos 1027-1336 do genoma do HCV1; AlwnI-SacII, 247 bp, correspondendo aos amino ácidos 1336-1419 do genoma HCV-1; HinfI-BglI, 175 bp, correspondendo aos amino ácidos 1449-1509 do genoma do HCV1.; BglI-PstI, 619 bp, correspondendo aos amino ácidos 1510-1711 do genoma do HCV1, mais o códon de terminação de transcrição. Um fragmento sinteticamente gerado SacII-HinfI de 91 bp, correspondendo aos amino ácidos 1420-1448 do genoma do HCV1 e contendo as mutações de PI (Thr-1428 mutada a Pro, Ser-149 mutada a Ile), foi ligado com o fragmento Hinfl-BglI de 175 bp e o fragmento

BglI-PstI de 619 bp descrito acima e subclonado em um vetor pGEM-5Zf(+) diferido com SacII e PstI. pGEM-5Zf(+) é um vetor *E. coli* comercialmente disponível (Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL Número de Acesso X65308). Após a transformação de células HB101 competentes, análise de miniseleção de clones individuais e verificação de seqüência, um fragmento de SacII-PstI de 885 bp de pGEM5.PI clone2 foi purificado com gel. Este fragmento foi ligado com fragmento de EcoRI-AlwnI de 935 bp, o fragmento de AlwnI-SacII de 247 bp e o vetor de Eco-RI-PstI de pAcHLT, descrito acima. A construção resultante foi denominada pAcHLTns34aPI.

A mistura de ligação acima foi transformada em células competentes HB 101 e colocada em placa com agar Luria contendo 100 µg/ml de ampicilina. Análise de miniprep de clones individuais levaram à identificação de positivos putativos, dois dos quais foram amplificados. O DNA de plasmídio para pSP72 1aHC, clones #1 e #2 foram preparados com o kit Oiagen Maxiprep e foram sequenciados.

A seguir, os seguintes fragmentos foram ligados juntos: (a) um fragmento HindIII-ClaI de 761 bp de pSP721aHC #1(pSP72.1aHC foi gerado pela ligação junto do seguinte: pSP72 que foi digerido com HindIII e ClaI, oligonucleotídeos sintéticos forneceriam um sítio de clonagem 5´HindIII, seguido pela seqüência ACAAAACAAA, o códon de iniciação ATG, e códons para HCVa, começando com o amino ácido 1027 e continuando para um sítio NglII 1046, e um fragmento de restrição BglII-ClaI de 683 bp (codificando os amino ácidos 1046-1274) de pAcHLTns3ns4aPI); (b) um fragmento de Bam-HI-HindIII de 1353 bp para o promotor

híbrido de levedura ADH2/GAPDH; (c) um fragmento de ClaI-SalI de 1320 bp (codificando um amino ácido de HCV1 1046-1711 com Thr 1428 mutada a Pro e Ser 1429 mutada a Ile) de pAcHLTns3ns4aPI; e (d) o vetor de expressão de levedura de pBS24.1 que foi digerido com BamHI e SalI, desfosforilada e purificada com gel. A mistura de ligação foi transformada em HB101 competente e colocado em placa com agar Luria contendo 100 μg/ml de ampicilina. Análises miniprep de colônias individuais levaram à identificação de clones com a inserção de BamHI-SalI de 3446 bp que estava compreendido do promotor ADH2/GAPDH, o códon iniciador ATG e HCV1a NS3/4a dos amino ácidos 1027-1711 (mostrado como os amino ácidos 1-686 das Figura 4A-4D), com Thr 1428 (posição de amino ácido 403 das Figuras 4A-4D) mutada a Pro e Ser 1429 (posição de amino ácido 404 das Figuras 4A-4D) mutada a Ile. A construção foi denominada pd.HCV1a.ns3ns4aPI (veja, Figura 5).

Linhagem de *S. cerevisae* AD3 foi transformada com pd.HCV1a.ns3ns4aPI e transformantes únicos foram verificados para expressão após depleção de glucose no meio. A proteína recombinante foi expressada em níveis altos em levedura, como detectado por coloração com azul Coomasssie e confirmada por análise imunoblot usando um anticorpo policlonal ao domínio helicase de NS3.

Exemplo 3

Purificação de epítope conformacional NS3/4a

Um epítope conformacional de NS3/4a foi purificado como se segue. Células *S. cerivisae* citadas acima, expressando um epítope de NS3/4a foram colocadas em cultura como descrito acima. As células foram suspensas em tampão

de lise (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMFS 1 mM, pepstatina 0,1 μM, leupeptina 1 μM) e lisada em um Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofon, Basel, Switzerland) ou parelho equivalente usando contas de vidro, a uma razão de células: tampão: contas de vidro 0,5 mm 1: 1: 1. O lisato foi centrifugado a 30100 x g por 30 min a 4°C e a pelota contendo a fração de proteína insolúvel foi adicionada para lavar tampão (6 ml/g de peso de pelota de célula de partida) e agitadas a temperatura ambiente por 15 min. O tampão de lavagem consistia em $NaPO_4$ 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3M, β-mercaptoletanol 5 mM, glicerol 10%, glucosida de octila 0,05%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pepstatina 0,1 μM, leupeptina 1 μM. Resíduos de células foram removidos por centrifugação a 30100 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a pelota retida.

A proteína foi extraída da pelota como se segue. 6 mg/ml de tampão de extração foi adicionado e agitado a temperatura ambiente por 15 min. O tampão de extração consistia em Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 1M, β-mercaptoetanol 5 mM, glicerol 10%, EDTA 1 mM, PMFS 1 mM, pepstatina 0,1 μM, leupeptina 1 μM. Este foi centrifugado a 30100 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi retido e sulfato de amônio adicionado a 17,5%usando a seguinte fórmula / (1 - x% sulfato de amônio) = ml de sulfato de amônio saturado 4,1M para adicionar o sobrenadante. O sulfato de amônio foi adicionado gota a gota enquanto agitava-se em gelo e a solução agitada em gelo por 10 min. A solução foi centrifugada a 17700 x g por 30 min a 4°C e a pelota retida e armazenada a 2°C a 8°C para até 48 h.

A pelota foi ressuspensa e testada em uma coluna Poly

U (Poly U Sepharose 4B, Amersham Pharmacia) a 4§C como se segue. A pelota foi ressuspensa em 6 ml de tampão de equilíbrio Poly U por grama de peso de pelota. O tampão de equilíbrio consistia em HEPES 25 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, DTT 5 mM (adicionado fresco), glicerol 10%, glucosida de octila 1,2. A solução foi agitada a 4°C por 15 min e centrifugada a 31000 x g por 30 min a 4°C.

Uma coluna Poly U (1 ml de resina por grama de peso de pelota de partida) foi preparada. taxa de escoamento linear foi de 60 cm/h e taxa de escoamento de empacotamento foi de 133% de 60 cm/h. A coluna foi equilibrada com tampão de equilíbrio e o sobrenadante da pelota de sulfato de amônio ressuspensa foi carregada sobre a coluna equilibrada. A coluna foi lavada para a linha base com o tampão de equilíbrio e a proteína com uma etapa de eluição no seguinte tampão de eluição Poly U: HEPES 25 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M, DTT 5 mM (adicionado fresco), glicerol 10%, glucosida de octila 1,2. O eluado da coluna foi testado em SDS-PAGE (colorido com Coomassie) e alíquotas congeladas e armazenadas a -80°C. A presença do epítope NS3/4a foi confirmado por Western blot, usando um anticorpo policlonal direcionado contra o domínio de protease de NS3e um anticorpo monoclonal contra o epítope 5-1-1 (HCV 4a).

Adicionalmente, a atividade da enzima protease foi monitorada durante a purificação como se segue. Um peptídeo NS4A (KKGSVVIVGRIVLSGKPAIIPKK), e a amostra contendo o epítope conformacional NS3/4a, foram diluídos em 90 µl de tampão de reação (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 0,15M, EDTA 0,5 mM, glicerol 10%, 0,05 n-dodecil B-D-Maltoside, DTT 5 mM) e deixada misturar por 30 minutos a temperatura ambiente. 90

µl da mistura foram adicionados a uma placa de microtítulo (Costar, Inc., Corning, NY) e 10 µl do substrato HCV (AnaSpec, Inc., San Jose CA) foram adicionados. A placa foi misturada e lida em uma leitora de placa Fluostar. Resultados foram expressos como unidades de fluorescência relativas (RFU) por minuto.

Usando esse métodos, o produto da extração de NaCl 1M continha atividade de 3,7 RFU/min, o precipitado de sulfato de amônio tinha uma atividade de 7,5 RFU/min e o produto da purificação Poly U tinha uma atividade de 18,5 RFU/min.

Exemplo 4

Estudos de competição

O seguinte estudo de competição foi conduzido a fim de avaliar se o epítope conformacional NS3/4a detectou diferentes anticorpos de outros antígenos de HCV. Em particular, o antígeno NS3/4a foi comparado com o antígeno c200 como se segue.

0,5 µg e 1,0 µg de NS3/4a, produzido como descrito acima, ou c200 (*Hepatology* (1992) 15: 19-25, disponível no ORTHO HCV Version 3.0 ELISA test System, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey), foram misturados com 20 µl de amostra de PHV914-5 (um sangramento de soroconversão anterior obtido do sangue de um indivíduo infectado) em um volume total de 200 µl (1 x PBS). A mistura foi incubada por 1 hora em microcavidades a 37°C. A mistura foi depois transferida a placas revestidas com NS3/4a e incubadas por 1 hora a 37°C. Placas foram lavadas e avaliadas como se segue.

1 µg de antígeno de c200 foram adicionados a 10 µl de amostra PHV914-5 em um volume total de cerca de 220 µl. A

mistura foi incubada por 1 hora em uma micro cavidade a 37°C e 200 µl transferidos a uma placa revestida com NS3/4a (100 ng/ensaio) e incubadas por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas cinco vezes com 1 x PBS, Tween-10 0,1%. 200 µl de solução conjugada (descrita acima) foram adicionados, e as placas incubadas e avaliadas. Os controles que consistiam PHV914-5 e 1 x PBS (sem antígeno) foram também tratadas como acima.

Os resultados são mostrados na tabela 7. Resultados de inibição percentual mostrados na coluna 4 são calculados como coluna 3 menos (coluna 2 dividido por coluna 3 vezes 100). Como pode ser visto, os dados mostram que NS3/4a é neutralizado por anticorpos de soroconversão anterior e c200 não. Um sinal forte foi alcançado quando os anticorpos em membros de painel de soroconversão anterior PHV914-5 c33c reagido com a NS34a revestido na placa. O antígeno c200 não foi neutralizado por esses anticorpos. Isto é mostrado no painel de topo da Tabela 7. Quando NS34a foi misturado com a amostra PHV914-5, ele foi neutralizado e consequentemente nenhum anticorpo estava presente na amostra para reagir com NS34a que foi revestido em microplaca. Os dados indicam que NS34a pode ser detectado por uma classe diferente de anticorpos daquela detectada por c200.

Tabela 7. Estudos de competição para mostrar que o antígeno NS34a detecta diferentes anticorpos em painel de soroconversão c33c anterior comparado ao antígeno c200

	1	2	3	4
c200	+	PHV914-5	*Controle 1xPBS	% Inibição

	s	s	
1 µg	1,450	1,645	12
1 µg	1,545	1,687	8
0,5 µg	1,557	1,913	19
0,5µg	1,719	1,804	5
NS3/4a	PHV914-5		
	s	s	
1 µg	0,054	1,599	97
1 µg	0,037	1,677	98
0,5 µg	0,066	1,672	96
0,5 µg	NA	1,524	NA

Exemplo 5

Estudos de estabilidade de epítope conformacional de NS34a

Para avaliar a função de estabilidade do epítope NS3/4a para ensaiar o desempenho, o seguinte estudo foi feito para determinar uma imunoreatividade NS3/4a versus tempo a temperatura ambiente. Alíquotas menores de estocagem NS3/4a foram deixadas agitar a temperatura ambiente e depois congeladas a intervalos na Tabela 8. Todos os frascos foram revestidos simultaneamente e testados contra dois painéis de soroconversão NS3 anterior.

Como pode ser visto na Tabela 8, a estocagem de NS3/4a não é estável e a imunoreatividade decresce com o tempo. Além disso, mantendo conformação NS3/4a é necessária para imunoreatividade.

Estudos de estabilidade adicionais foram conduzidos como se segue. Dois anticorpos monoclonais conformacionais feitos contra NS3/4a usando procedimentos padrão foram substituídos por painéis de soroconversão anterior anti-

HCV. Frascos de NS3/4a de estocagem foram armazenados a temperatura ambiente em intervalos de 3, 6 e 24 horas. O NS3/4a dos frascos congelados foi revestido a 90 ng/ml e submetidos a ensaio usando o procedimento descrito acima. Os resultados sugeriram que os dois monoclonais eram na verdade conformacionais e sua atividade foi sensível à manipulação de antígeno de NS3/4a a temperatura ambiente. A reatividade de um anticorpo monoclonal de controle positivo não variou.

Tabela 8

Tempo (h)	0	6	21,4	9	35,5	46	52	controle
	A	D	G	H	I	K	N	referência
	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co
PHV 904-1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PHV 904-2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PHV 904-3	1,5	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8
PHV 904-4	3,7	1,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	4,4
PHV 904-5	4,8	2,0	0,7	0,6	0,3	0,2	0,3	5,5
PHV 904-6	5,4	2,8	1,1	1,0	0,6	0,5	0,6	5,8
PHV 904-7	5,1	6,4	1,5	1,0	1,1	0,5	0,7	5,4
PHV 914-1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PHV 914-2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PHV 914-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PHV 914-4	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
PHV 914-5	2,1	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0
PHV 914-6	2,3	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4

PHV 914-7	2,8	0,5	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	4,9
PHV 914-8	2,9	0,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4,9
Enzima								
RFU/min	8,75	4,14	3,08	1,88	1,75	1,75	0,75	

Exemplo 6

Imunoreatividade de epítope conformacional NS3/4a versus Ns3/4a desnaturado

A imunoreatividade do epítope conformacional NS3/4a, produzido como descrito acima, foi comparado a NS3/4a que tinha sido desnaturado por adição de SDS para preparação de epítope conformacional NS3/4a a uma concentração final de 2%. O NS3/4a e NS3/4a conformacional desnaturados foram revestidos em placas de microtítulo como descrito acima. O antígeno c200 (*Hepatology* (1992) 15: 19-25, disponível no ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ) foi também revestido em placas de microtitulação. O anrc200 foi usado como uma comparação, este sendo presumido por ser não conformacional devido à presença de agente de redução (DTT) e detergente (SDS) em sua formulação.

A imunoreatividade foi testada contra dois painéis de soroconversão de HCV, PHV 904 e PHV 914 (amostras de sangue humano comercialmente disponíveis junto a Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA). Os resultados são mostrados na Tabela 9. Os dados sugerem que a forma linearizada ou desnaturada de NS3/4a (assim como c200) não detecta painéis de soroconversão anterior tão anterior quanto o epítope conformacional NS3/4a.

Tabela 9

NS3/4a vs. NS3/4a versus NS3/4a vs desnaturada							
*SDS 2% de bloqueio para estocar NS3/4a							
		NS3/4a	dNS3/4a*	c200	NS3/4a	dNS3/4a*	c200
		OD	OD	OD	s/co	s/co	s/co
HCV	PHV 904-1	0,012	0,012	0,009	0,02	0,02	0,01
Soroconversões	PHV 904-2	0,011	0,009	0,008	0,02	0,01	0,01
	PHV 904-3	1,124	0,071	0,045	1,80	0,11	0,07
	PHV 904-4	2,401	0,273	0,129	3,85	0,44	0,21
	PHV 904-5	3,022	0,793	0,347	4,85	1,28	0,57
	PHV 904-6	2,711	1,472	0,774	4,35	2,37	1,28
	PHV 904-7	3,294	1,860	0,943	5,28	2,99	1,55
	PHV 914-1	0,006	0,004	0,001	0,01	0,01	0,00
	PHV 914-2	0,005	0,004	0,002	0,01	0,01	0,00
	PHV 914-3	0,098	0,003	0,001	0,16	0,00	0,00
	PHV 914-4	1,118	0,006	0,004	1,79	0,01	0,01
	PHV 914-5	2,035	0,044	0,022	3,26	0,07	0,04

	PHV 914-6	2,092	0,074	0,025	3,35	0,12	0,04
	PHV 914-7	2,519	0,281	0,132	4,04	0,45	0,22
	PHV 914-8	2,746	0,907	0,500	4,40	1,46	0,82
	PHV 914-9	3,084	1,730	0,931	4,94	2,78	1,53
HCV 3.0	Cont. neg.	0,023	0,024	0,008			
Controles	Cont. neg.	0,027	0,024	0,007			
	Cont. neg.	0,021	0,017	0,005			
	Média	0,024	0,022	0,007			
	Corte	0,624	0,622	0,607			
	Cont. pos.	1,239	0,903	0,575	1,99	1,45	0,95
	Cont. pos.	1,445	0,916	0,614	2,32	1,47	1,01

A imunoreatividade do epítope conformacional foi também testada usando anticorpos monoclonais para NS3/4a, feita usando procedimentos padrão. Esses anticorpos monoclonais foram depois testados no formato ELISA contra NS3/4a e NS3/4a desnaturado e antígeno c200. Os dados mostram que os monoclonais anti-NS3/4a reagem para o NS3/4a e NS3/4a desnaturado de forma similar aos painéis de soroconversão mostrados na Tabela 10. Este resultado também fornece evidência de que o NS3/4a é conformacional de natureza como anticorpos monoclonais podem ser feitos os quais são similares em reatividade aos painéis de soroconversão c33c anterior.

Tabela 10

		Placa		
		NS3/4a	d NS3/4a	c200
Monoclonal		OD	OD	OD
4B9/E3	1:100	1,820	0,616	0,369
	1:1000	1,397	0,380	0,246
	1:10000	0,864	0,173	0,070
	1:20000	0,607	0,116	0,085
5B7/D7	1:100	2,885	0,898	0,436
	1:1000	2,866	0,541	0,267
	1:10000	1,672	0,215	0,086
	1:20000	1,053	0,124	0,059
1A8/H2	1:100	1,020	0,169	0,080
	1:1000	0,921	0,101	0,043
	1:10000	0,653	0,037	0,013
	1:20000	0,337	0,027	0,011

Desse modo, novos ensaios de detecção de HCV foram

descritos. Da descrição anterior, será apreciado que, embora realizações específicas da invenção tenham sido descritas aqui para fins de ilustração, várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e escopo da descrição.

REIVINDICAÇÕES

1. Suporte sólido de imunoensaio, **caracterizado** pelo fato de que compreende pelo menos um anticorpo anti-núcleo do vírus da hepatite C (HCV) e pelo menos um epítopo NS3/4a do HCV isolado ligado ao mesmo, em que o dito epítopo NS3/4a compreende a sequência de aminoácidos da SEQ. ID NO. 3, a qual possui atividade de protease, em que o dito pelo menos um anticorpo anti-núcleo é selecionado a partir do grupo consistindo em c11-3, c11-7 e c11-14.

2. Suporte sólido de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende pelo menos dois anticorpos anti-núcleo do HCV ligados ao mesmo.

3. Suporte sólido de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o dito epítopo NS3/4a é um epítopo conformacional e compreende a sequência de aminoácidos da SEQ. ID NO. 3.

4. Suporte sólido de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente um antígeno de fusão de epítopo múltiplo ligado ao mesmo.

5. Suporte sólido de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o dito antígeno de fusão de epítopo múltiplo compreende a sequência de aminoácidos da SEQ. ID NO. 5.

6. Método de detecção de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em uma amostra biológica, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) fornecimento de um suporte sólido de imunoensaio conforme definido na reivindicação 1;

(b) combinação de uma amostra biológica com o dito

suporte sólido sob condições que permitem que anticorpos e antígenos do HCV, quando presentes na amostra biológica, se aglutinem ao dito pelo menos um anticorpo anti-núcleo e ao dito epítopo NS3/4a, respectivamente;

(c) adição ao suporte sólido da etapa (b) sob condições de formação de complexo de (i) um primeiro anticorpo detectavelmente marcado, em que o primeiro anticorpo detectavelmente marcado é um anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado, em que o anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítopo de núcleo do HCV diferente do que pelo menos um anticorpo anti-núcleo ligado ao suporte sólido; (ii) um antígeno que reage com um anticorpo do HCV da amostra biológica reativo com o dito epítopo NS3/4a; e (iii) um segundo anticorpo detectavelmente marcado, em que o dito segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com o antígeno de (ii);

(d) detecção de complexos formados entre os anticorpos e antígenos, se houver, como uma indicação de infecção por HCV na amostra biológica.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o dito pelo menos um anticorpo anti-núcleo é direcionado contra uma região com N terminal do antígeno de núcleo do HCV, que é selecionado a partir do grupo consistindo em C11-3 e c11-7; e o dito anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado é direcionado contra uma região com C terminal do antígeno do núcleo do HCV, o qual é c11-4.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o antígeno que reage com um anticorpo do HCV da amostra biológica compreende um epítopo da região c33c da poliproteína do HCV.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o epítopo c33c é fundido com uma sequência de aminoácidos de superóxido dismutase humana (hSOD) e o segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com a sequência de aminoácidos de hSOD.

10. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o epítopo NS3/4a é um epítopo conformacional e compreende a sequência de aminoácidos da SEQ. ID NO. 3.

11. Método de detecção de infecção com o vírus da hepatite C (HCV) em uma amostra biológica, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) fornecimento de um suporte sólido de imunoensaio conforme definido na reivindicação 2;

(b) combinação de uma amostra biológica com o suporte sólido sob condições que permitem que anticorpos e antígenos do HCV, quando presentes na amostra biológica, se aglutinem a pelo menos dois anticorpos anti-núcleo e ao dito epítopo NS3/4a, respectivamente;

(c) adição do suporte sólido da etapa (b) sob condições de formação de complexo de (i) um primeiro anticorpo detectavelmente marcado, em que o primeiro anticorpo detectavelmente marcado é um anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado, em que o anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítopo de núcleo do HCV diferente do que pelo menos dois anticorpos anti-núcleo ligados ao suporte sólido; (ii) um epítopo da região c33c da poliproteína do HCV fundida a uma sequência de aminoácidos de hSOD; e (iii) um segundo anticorpo detectavelmente marcado, em que o segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com a sequência de aminoácidos de hSOD;

(d) detecção de complexos formados entre os anticorpos e antígenos, se houver, como uma indicação de infecção por HCV na amostra biológica.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o dito epítopo NS3/4a é um epítopo conformacional e compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 3.

13. Método de detecção de infecção com o vírus da hepatite C (HCV) em uma amostra biológica, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) fornecimento de um suporte sólido de imunoensaio conforme definido na reivindicação 4;

(b) combinação de uma amostra biológica com o suporte sólido sob condições que permitem que anticorpos e antígenos do HCV, quando presentes na amostra biológica, se aglutinem a pelo menos um anticorpo anti-núcleo, ao dito epítopo NS3/4a, e ao dito antígeno de fusão do epítopo múltiplo;

(c) adição ao suporte sólido da etapa (b) sob condições de formação de complexo de (i) um primeiro anticorpo detectavelmente marcado, em que o primeiro anticorpo detectavelmente marcado é um anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado, em que o dito anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítopo de núcleo do HCV diferente do que pelo menos um anticorpo anti-núcleo ligado ao suporte sólido; (ii) primeiro e segundo antígenos que reagem com um anticorpo do HCV da amostra biológica reativa com o epítopo NS3/4a e o dito antígeno de fusão do epítopo múltiplo, respectivamente; e (iii) um segundo anticorpo detectavelmente marcado, em que o dito segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com os antígenos de (ii);

(d) detecção de complexos formados entre os anticorpos

e antígenos, se houver, como uma indicação de infecção por HCV na amostra biológica.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o dito pelo menos um anticorpo anti-núcleo é direcionado contra uma região com N terminal do antígeno de núcleo do HCV, o qual é selecionado a partir do grupo consistindo em c11-3 e c-11-7, e o dito primeiro anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado é direcionado contra uma região com C terminal do antígeno do núcleo do HCV, o qual é c11-4.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o dito primeiro antígeno que reage com um anticorpo do HCV da amostra biológica compreende um epítopo da região c33c da poliproteína do HCV.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o epítopo c33c é fundido com uma sequência de aminoácidos de superóxido dismutase humana (hSOD) e o segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com a sequência de amino ácido de hSOD.

17. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o dito segundo antígeno que reage com um anticorpo do HCV da amostra biológica compreende um epítopo da região c22 da poliproteína do HCV.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o epítopo da região c22 compreende aminoácidos Lys_{10} a Ser_{99} da poliproteína do HCV, com uma deleção de Arg_{47} e uma substituição de Leu por Trp na posição 44, numerada em relação à sequência de poliproteína do HCV1, em que o dito epítopo é fundido com uma sequência de aminoácidos de superóxido dismutase humana (hSOD) e o segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com a sequência

de aminoácidos de hSOD.

19. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o dito antígeno de fusão de epítopo múltiplo compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 5.

20. Kit de teste de imunodiagnóstico, **caracterizado** pelo fato de que compreende o suporte sólido de imunoensaio conforme definido na reivindicação 1, e instruções para condução do teste de imunodiagnóstico.

21. Suporte sólido de imunoensaio, **caracterizado** pelo fato de que compreende dois anticorpos monoclonais anti-núcleo de vírus da hepatite C (HCV) e um epítopo conformacional NS3/4a do HCV compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 3, ligados ao mesmo, em que os ditos anticorpos anti-núcleo são selecionados a partir do grupo consistindo em c11-3, c11-7 e c11-14.

22. Suporte sólido de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que os ditos dois anticorpos anti-núcleo são direcionados contra uma região com N terminal do antígeno de núcleo do HCV, os quais são selecionados a partir de c11-3 e c-11-7.

23. Método de detecção de infecção com o vírus da hepatite C (HCV) em uma amostra biológica, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) fornecimento de um suporte sólido de imunoensaio conforme definido na reivindicação 21;

(b) combinação de uma amostra biológica com o suporte sólido sob condições que permitem que anticorpos e antígenos do HCV, quando presentes na amostra biológica, se aglutinem a pelo menos dois anticorpos anti-núcleo e ao dito epítopo NS3/4a conformacional, respectivamente;

(c) adição ao suporte sólido da etapa (b) sob condições de formação de complexo de (i) um primeiro anticorpo detectavelmente marcado, em que o dito primeiro anticorpo detectavelmente marcado é um anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado, em que o dito anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítopo de núcleo do HCV diferente do que pelo menos dois anticorpos anti-núcleo ligados ao suporte sólido; (ii) um epítopo da região c33c da poliproteína do HCV fundido a uma sequência de aminoácidos de hSOD; e (iii) um segundo anticorpo detectavelmente marcado, em que o segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com a dita sequência de aminoácidos de hSOD;

(d) detecção de complexos formados entre os anticorpos e antígenos, se houver, como uma indicação de infecção por HCV na amostra biológica.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que os ditos pelo menos dois anticorpos anti-núcleo são direcionados contra uma região com N terminal do antígeno de núcleo do HCV, o quais consistem nos anticorpos c11-3 e c11-7; e o dito anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado é direcionado contra uma região com C terminal do antígeno do núcleo do HCV, o qual é c11-4.

25. Kit de teste de imunodiagnóstico, **caracterizado** pelo fato de que compreende o suporte sólido de imunoensaio conforme definido na reivindicação 21, e instruções para condução do teste de imunodiagnóstico.

26. Suporte sólido de imunoensaio, **caracterizado** pelo fato de que compreende dois anticorpos monoclonais anti-núcleo de vírus da hepatite C (HCV), um epítopo conformacional NS3/4a do HCV compreendendo a sequência de

aminoácidos da SEQ ID NO. 3, e um antígeno de fusão de epítopo múltiplo compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 5, ligados ao mesmo, em que os ditos anticorpos anti-núcleo são selecionados a partir do grupo consistindo em c11-3, c11-7 e c11-14.

27. Método de detecção de infecção com o vírus da hepatite C (HCV) em uma amostra biológica, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) fornecimento de um suporte sólido de imunoensaio conforme definido na reivindicação 26;

(b) combinação de uma amostra biológica com o suporte sólido sob condições que permitem que anticorpos e antígenos do HCV, quando presentes na amostra biológica, se aglutinem a pelo menos dois anticorpos anti-núcleos, ao dito epítopo NS3/4a, e ao dito antígeno de fusão do epítopo múltiplo, respectivamente;

(c) adição ao suporte sólido da etapa (b) sob condições de formação de complexo de (i) um primeiro anticorpo detectavelmente marcado, em que o dito primeiro anticorpo detectavelmente marcado é um anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado, em que o dito anticorpo anti-núcleo marcado é direcionado contra um epítopo de núcleo do HCV diferente do que pelo menos dois anticorpos anti-núcleo ligados ao suporte sólido; (ii) um epítopo da região c33c da poliproteína do HCV fundido a uma
sequência de aminoácidos de hSOD; e (iii) um segundo anticorpo detectavelmente marcado, em que o dito segundo anticorpo detectavelmente marcado é reativo com as ditas sequências de aminoácidos de hSOD;

(d) detecção de complexos formados entre os anticorpos e antígenos, se houver, como uma indicação de infecção por

HCV na amostra biológica.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que os ditos pelo menos dois anticorpos anti-núcleos, são direcionados contra uma região com N terminal do antígeno de núcleo do HCV, o quais são os anticorpos c11-3 e c11-7; e o dito anticorpo anti-núcleo do HCV detectavelmente marcado é direcionado contra uma região com C terminal do antígeno do núcleo do HCV, o qual é o anticorpo c11-4.

29. Método, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que o epítopo da região c22 da poliproteína do HCV compreende aminoácidos Lys_{10} a Ser_{99} da poliproteína do HCV, com uma deleção de Arg47 e uma substituição de Leu por Trp na posição 44, numerada em relação à sequência de poliproteína do HCV1.

30. Kit de teste de imunodiagnóstico, **caracterizado** pelo fato de que compreende o suporte sólido de imunoensaio conforme definido na reivindicação 26, e instruções para condução do teste de imunodiagnóstico.

31. Método de produção de um suporte sólido de imunoensaio, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) fornecimento de um suporte sólido; e

(b) aglutinação de pelo menos um anticorpo anti-núcleo do vírus da hepatite C (HCV) e pelo menos um epítopo conformacional NS3/4a do HCV isolado ao mesmo, em que o dito epítopo NS3/4a compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 3, a qual possui atividade de protease,

em que os ditos anticorpos anti-núcleo são selecionados a partir do grupo consistindo em c11-3, c11-7 e c11-14.

32. Método de produção de um suporte sólido de imunoensaio, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) fornecimento de um suporte sólido; e

(b) aglutinação de pelo menos dois anticorpos anti-núcleo do vírus da hepatite C (HCV) e um epítopo conformacional NS3/4a do HCV isolado ao mesmo, em que o dito epítopo NS3/4a compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 3, a qual possui atividade de protease,

em que os ditos anticorpos anti-núcleo são selecionados a partir do grupo consistindo em c11-3, c11-7 e c11-14.

33. Método, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente aglutinação de pelo menos um antígeno de fusão de epítopo múltiplo ao suporte sólido.

34. Método, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente aglutinação de pelo menos um antígeno de fusão de epítopo múltiplo ao suporte sólido.

35. Método de produção de um suporte sólido de imunoensaio, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) fornecimento de um suporte sólido; e

(b) aglutinação de dois anticorpos anti-núcleo do vírus da hepatite C (HCV), um epítopo conformacional NS3/4a do HCV isolado e um antígeno de fusão de epítopo múltiplo ao mesmo, em que o dito epítopo NS3/4a compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 3, a qual possui atividade de protease

em que os ditos anticorpos anti-núcleo são selecionados a partir do grupo consistindo em c11-3, c11-7 e c11-14.

Genoma HCV e Proteínas Recombinantes

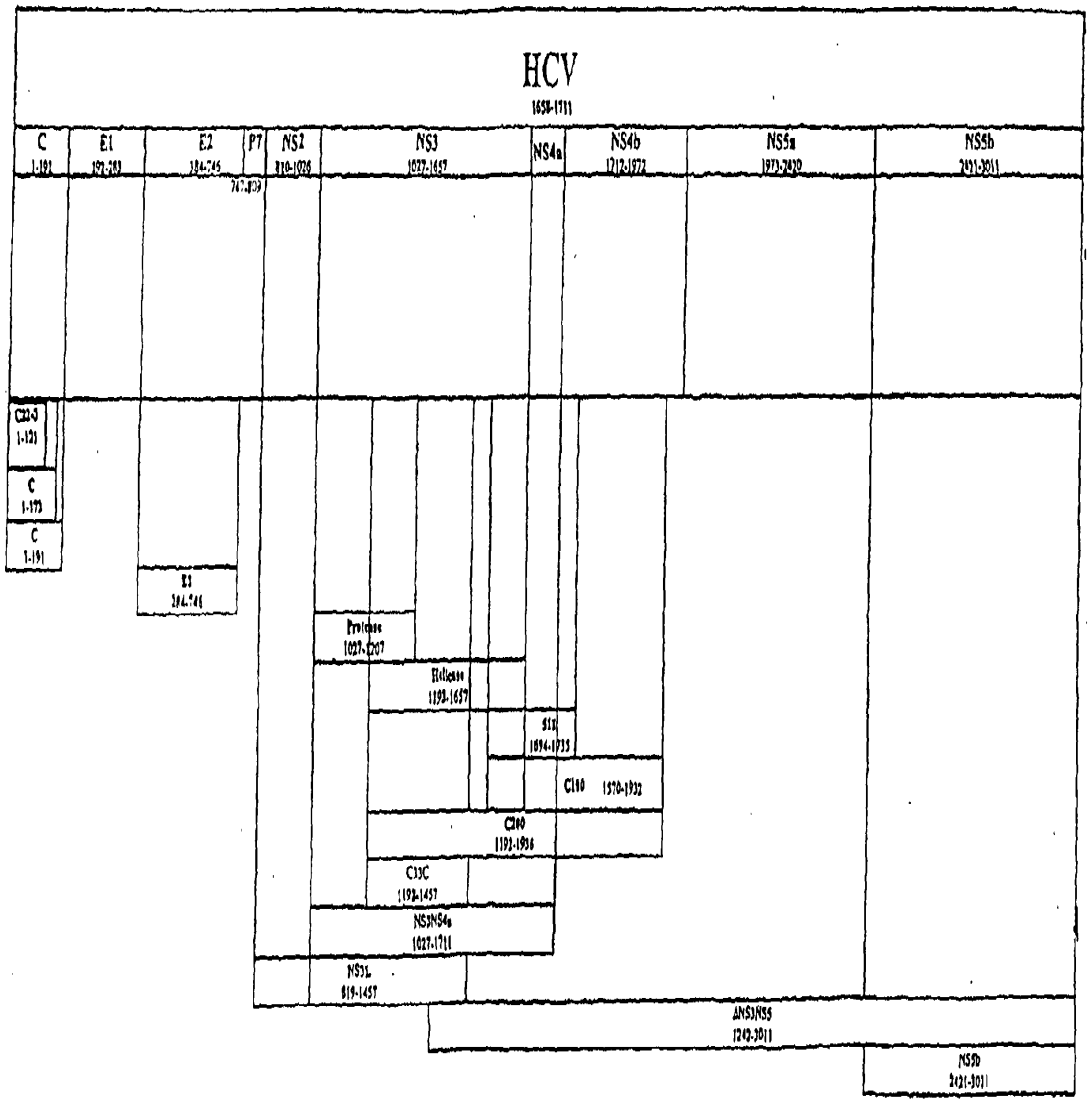


FIG. 1

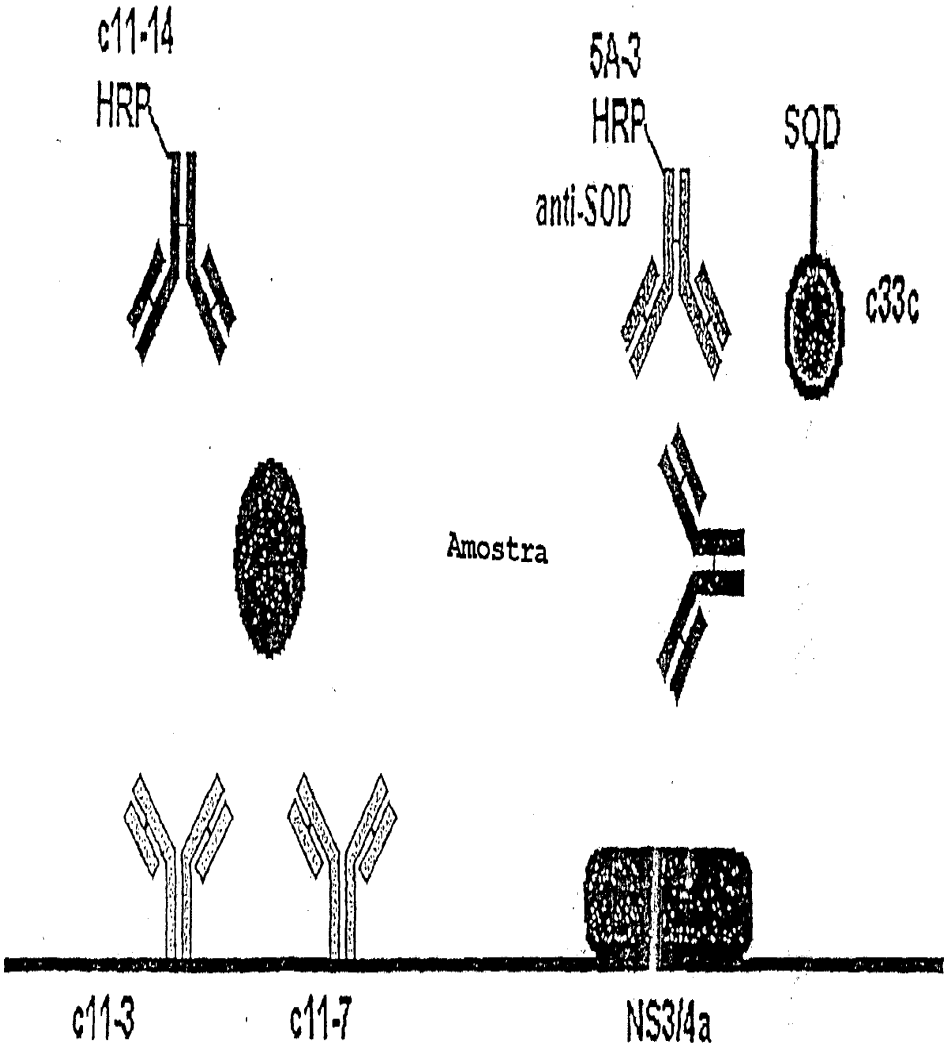


FIG. 2

```
MSPIDPMGHHHHHHGRRRASVAAGILVPRGSPGLDGICSIEEFAPITAYAQQTRGLLGCIITSLTGRDKNQVE  73
GEVQIVSTAAQTFLATCINGVCWTVYHGAGTRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGWPASQGTRSLTPCTCGSSD 146
LYLVTRHADVIPVRRRGDSRGSLLSPRPISYLKGSAGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVENLE 219
TTMRSPVFTDNSSPPVVPQSFQVAHLHAPTGSGKSTKVPAAYAAQGYKVLVLNPSVAATLGFGAYMSKAHGID 292
PNIRTGVRTITTGSPITYSTYGKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLAT 365
ATPPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEIPFYGKAIPLEVIKGGRHLIFCHSKKKCDELAAKLVALGINAVAYYRGL 438
DVSVIPPIGDVVVVATDALMTGYTGDFDSVIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETITLPQDAVSRTQRRGRTGRG 511
KPGIYRFVAPGERPSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETTVRLRAYMNTPGLPVCQDHLEFWEGVFTGLTH 584
IDAHFLSQTKQSGENLPYLVAYQATVCARAQAPPPSWDQMWKCLIRLKPTLHGPTPLLYRLGAVQNEITLTHP 657
VTKYIMTCMSADLEVVTSTWVLVGGVLAALAAYCLSTGCVVIVGRVVLSGKPAIIPDREVLYREFDEMEEC  728
```

FIG. 3

```
                                                                  10
                          1                                       Q
                          M   A   P   I   T   A   Y   A   Q
                        ATG GCG CCC ATC ACG GCG TAC GCC CAG CAG

                                                  20
 T   R   G   L   L   G   C   I   I   T   S   L   T   G   R
ACA AGG GGC CTC CTA GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GGC CGG

                      30                                          40
 D   K   N   Q   V   E   G   E   V   Q   I   V   S   T   A
GAC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG ATT GTG TCA ACT GCT

                                              50
 A   Q   T   F   L   A   T   C   I   N   G   V   C   W   T
GCC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT

                  60                                          70
 V   Y   H   G   A   G   T   R   T   I   A   S   P   K   G
GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT

                                          80
 P   V   I   Q   M   Y   T   N   V   D   Q   D   L   V   G
CCT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC

                  90                                          100
 W   P   A   P   Q   G   S   R   S   L   T   P   C   T   C
TGG CCC GCT CCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG ACA CCC TGC ACT TGC

                                      110
 G   S   S   D   L   Y   L   V   T   R   H   A   D   V   I
GGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT

                  120                                         130
 P   V   R   R   R   G   D   S   R   G   S   L   L   S   P
CCC GTG CGC CGG CGG GGT GAT AGC AGG GGC AGC CTG CTG TCG CCC

                                          140
 R   P   I   S   Y   L   K   G   S   S   G   G   P   L   L
CGG CCC ATT TCC TAC TTG AAA GGC TCC TCG GGG GGT CCG CTG TTG

                  150                                         160
 C   P   A   G   H   A   V   G   I   F   R   A   A   V   C
TGC CCC GCG GGG CAC GCC GTG GGC ATA TTT AGG GCC GCG GTG TGC

                                          170
 T   R   G   V   A   K   A   V   D   F   I   P   V   E   N
ACC CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC

                  180                                         190
 L   E   T   T   M   R   S   P   V   F   T   D   N   S   S
CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT
```

FIG. 4A

```
                                                200
 P   P   V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A
CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT

                210                                     220
 P   T   G   S   G   K   S   T   K   V   P   A   A   Y   A
CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA

                                        230
 A   Q   G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A
GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA

                240                                     250
 T   L   G   F   G   A   Y   M   S   K   A   H   G   I   D
ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT

                                        260
 P   N   I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P
CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC

                270                                     280
 I   T   Y   S   T   Y   G   K   F   L   A   D   G   G   C
ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC

                                        290
 S   G   G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S
TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC

                300                                     310
 T   D   A   T   S   I   L   G   I   G   T   V   L   D   Q
ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA

                                        320
 A   E   T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T
GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC

                330                                     340
 P   P   G   S   V   T   V   P   H   P   N   I   E   E   V
CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT

                                        350
 A   L   S   T   T   G   E   I   P   F   Y   G   K   A   I
GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC

                360                                     370
 P   L   E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT

                                        380
 S   K   K   K   C   D   E   L   A   A   K   L   V   A   L
TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG
```

FIG. 4B

```
                390                                                 400
 G   I   N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   V
GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC

                                    410
 I   P   P   I   G   D   V   V   V   V   A   T   D   A   L
ATC CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC

                420                                                 430
 M   T   G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   N
ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT

                                    440
 T   C   V   T   Q   T   V   D   F   S   L   D   P   T   F
ACG TGT GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC

                450                                                 460
 T   I   E   T   I   T   L   P   Q   D   A   V   S   R   T
ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT

                                    470
 Q   R   R   G   R   T   G   R   G   K   P   G   I   Y   R
CAA CGT CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA

                480                                                 490
 F   V   A   P   G   E   R   P   S   G   M   F   D   S   S
TTT GTG GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC

                                    500
 V   L   C   E   C   Y   D   A   G   C   A   W   Y   E   L
GTC CTC TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC

                510                                                 520
 T   P   A   E   T   T   V   R   L   R   A   Y   M   N   T
ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC

                                    530
 P   G   L   P   V   C   Q   D   H   L   E   F   W   E   G
CCG GGG CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC

                540                                                 550
 V   F   T   G   L   T   H   I   D   A   H   F   L   S   Q
GTC TTT ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG

                                    560
 T   K   Q   S   G   E   N   L   P   Y   L   V   A   Y   Q
ACA AAG CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA

                570                                                 580
 A   T   V   C   A   R   A   Q   A   P   P   P   S   W   D
GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC
```

FIG. 4C

```
                                                590
 Q   M   W   K   C   L   I   R   L   K   P   T   L   H   G
CAG ATG TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG

                600                                     610
 P   T   P   L   L   Y   R   L   G   A   V   Q   N   E   I
CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC


                                            620
 T   L   T   H   P   V   T   K   Y   I   M   T   C   M   S
ACC CTG ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG

                630                                     640
 A   D   L   E   V   V   T   S   T   W   V   L   V   G   G
GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG CTC GTT GGC GGC

                                            650
 V   L   A   A   L   A   A   Y   C   L   S   T   G   C   V
GTC CTG GCT GCT TTG GCC GCG TAT TGC CTG TCA ACA GGC TGC GTG

                660                                     670
 V   I   V   G   R   V   V   L   S   G   K   P   A   I   I
GTC ATA GTG GGC AGG GTC GTC TTG TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

                                            680
 P   D   R   E   V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E
CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

686
 C
TGC
```

FIG. 4D

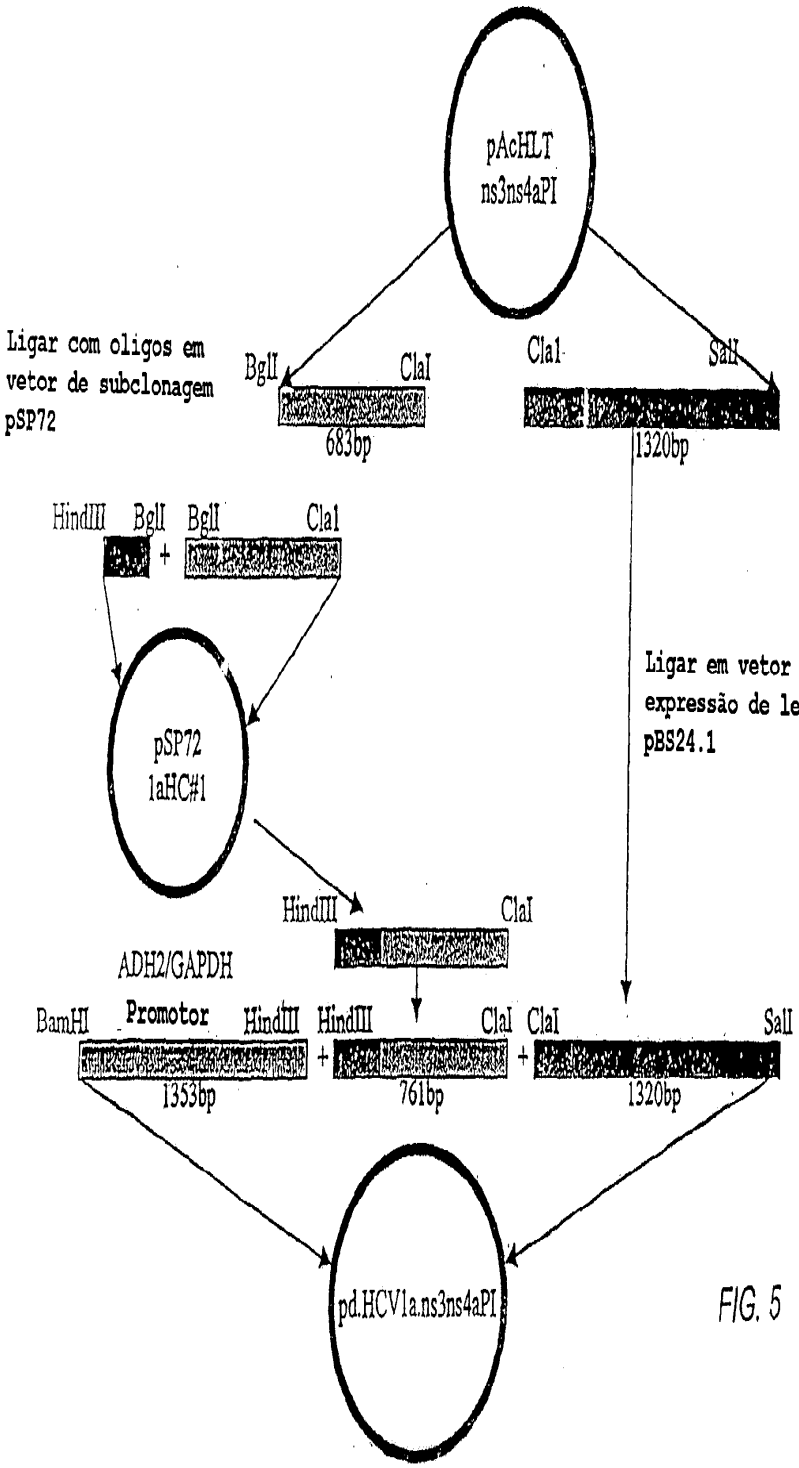
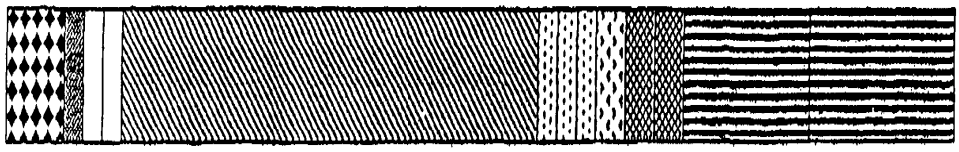

pAcHLT
ns3ns4aPI
Ligar com oligos em
vetor de subclonagem
pSP72
BglI
ClaI
ClaI
SalI
683bp
1320bp
HindIII BglI BglI ClaI
+
pSP72
1aHC#1
Ligar em vetor de
expressão de levedura
pBS24.1
HindIII
ClaI
ADH2/GAPDH
BamHI
Promotor
HindIII
HindIII
ClaI
ClaI
SalI
+
+
1353bp
761bp
1320bp
pd.HCV1a.ns3ns4aPI

FIG. 5

Construção de Antígeno de MEFA 12



SOD

E1

E2 HVR1a

E2 HVR 1+2 Consenso

C33c Curto

5-1-1: 1+3+2

C100-1 C-terminal

NS5 maior 1a

núcleo 1+2

FIG. 6

```
  1                                                  10
  M   A   T   K   A   V   C   V   L   K   G   D   G   P   V
ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TTG AAG GGT GAC GGC CCA GTT  45

                      20                                  30
  Q   G   I   I   N   F   E   Q   K   E   S   N   G   P   V
CAA GGT ATT ATT AAC TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG  90

                                                  40
  K   V   W   G   S   I   K   G   L   T   E   G   L   H   G
AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA  135

                      50                                  60
  F   H   V   H   E   F   G   D   N   T   A   G   C   T   S
TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT  180

                                                  70
  A   G   P   H   F   N   P   L   S   T   R   G   C   N   C
GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC ACG CGT GGT TGC AAT TGC  225

                      80                                  90
  S   I   Y   P   G   H   I   T   G   H   R   M   A   W   K
TCT ATC TAT CCC GGC CAT ATA ACG GGT CAC CGC ATG GCA TGG AAG  270

                                                 100
  L   G   S   A   A   R   T   T   S   G   F   V   S   L   F
CTT GGT TCC GCC GCC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC  315

                      110                                 120
  A   P   G   A   K   Q   N   E   T   H   V   T   G   G   A
GCC CCA GGT GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA  360

                                                 130
  A   A   R   T   T   S   G   L   T   S   L   F   S   P   G
GCC GCC CGA ACT ACG TCT GGG TTG ACC TCT TTG TTC TCC CCA GGT  405
```

```
                  140                                                 150
 A   S   Q   N   I   Q   L   I   T   S   T   D   N   S   S
GCC AGC CAA AAC ATT CAA TTG ATT ACT AGT ACG GAT AAC TCC TCT  450

                                  160
 P   P   V   V   P   Q   S   F   Q   V   A   H   L   H   A
CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT  495

                  170                                                 180
 P   T   G   S   G   K   S   T   K   V   P   A   A   Y   A
CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA  540

                                  190
 A   Q   G   Y   K   V   L   V   L   N   P   S   V   A   A
GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA  585

                  200                                                 210
 T   L   G   F   G   A   Y   M   S   K   A   H   G   I   D
ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT  630

                                  220
 P   N   I   R   T   G   V   R   T   I   T   T   G   S   P
CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC  675

                  230                                                 240
 I   T   Y   S   T   Y   G   K   F   L   A   D   G   G   C
ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC  720

                                  250
 S   G   G   A   Y   D   I   I   I   C   D   E   C   H   S
TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC  765

                  260                                                 270
 T   D   A   T   S   I   L   G   I   G   T   V   L   D   Q
ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATC GGC ACT GTC CTT GAC CAA  810

                                  280
 A   E   T   A   G   A   R   L   V   V   L   A   T   A   T
GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC  855

                  290                                                 300
 P   P   G   S   V   T   V   P   H   P   N   I   E   E   V
CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT  900
```

FIG. 7B

```
                                                  310
 A   L   S   T   T   G   E   I   P   F   Y   G   K   A   I
GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC  945

                  320                                     330
 P   L   E   V   I   K   G   G   R   H   L   I   F   C   H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT  990

                                                  340
 S   K   K   K   C   D   E   L   A   A   K   L   V   A   L
TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG 1035

                  350                                     360
 G   I   N   A   V   A   Y   Y   R   G   L   D   V   S   V
GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC 1080

                                                  370
 I   P   T   S   G   D   V   V   V   V   A   T   D   A   L
ATC CCG ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC 1125

                  380                                     390
 M   T   G   Y   T   G   D   F   D   S   V   I   D   C   N
ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT 1170

                                                  400
 T   C   A   C   S   G   K   P   A   I   I   P   D   R   E
ACG TGT GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA CCT GAC AGG GAA 1215

                  410                                     420
 V   L   Y   R   E   F   D   E   M   E   E   C   S   Q   H
GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG TGC TCT CAG CAC 1260

                                                  430
 L   P   Y   I   E   Q   G   M   M   L   A   E   Q   F   K
TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC GAG CAG TTC AAG 1305

                  440                                     450
 Q   K   A   L   G   L   S   R   G   G   K   P   A   I   V
CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG CCG GCA ATC GTT 1350

                                                  460
 P   D   K   E   V   L   Y   Q   Q   Y   D   E   M   E   E
CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT GAG ATG GAA GAG 1395
```

FIG. 7C

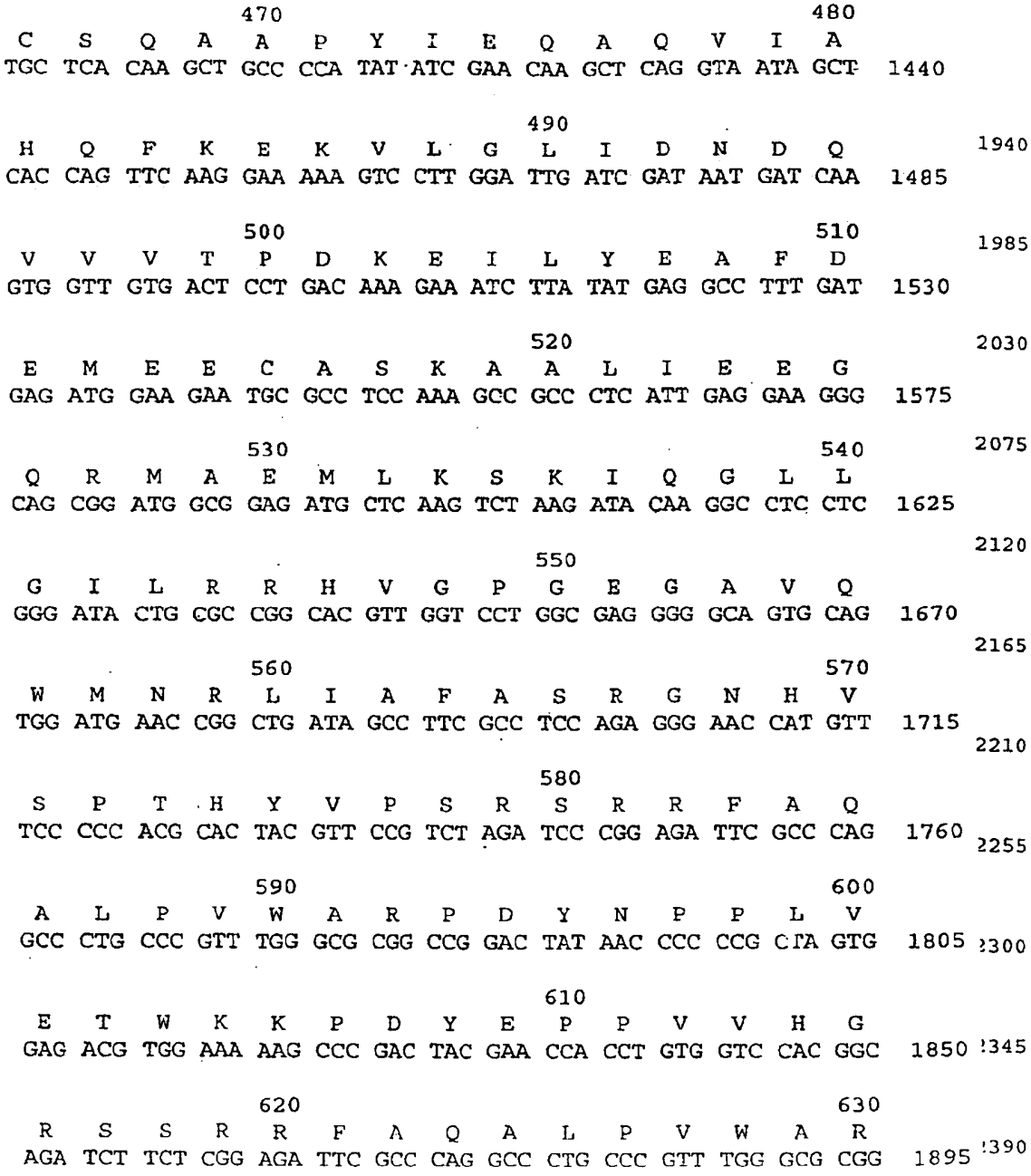

470 480
C S Q A A P Y I E Q A Q V I A
TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT CAG GTA ATA GCT 1440
490
H Q F K E K V L G L I D N D Q 1940
CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC GAT AAT GAT CAA 1485
500 510 1985
V V V T P D K E I L Y E A F D
GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT GAG GCC TTT GAT 1530
520 2030
E M E E C A S K A A L I E E G
GAG ATG GAA GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC ATT GAG GAA GGG 1575
530 540 2075
Q R M A E M L K S K I Q G L L
CAG CGG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA CAA GGC CTC CTC 1625
2120
550
G I L R R H V G P G E G A V Q
GGG ATA CTG CGC CGG CAC GTT GGT CCT GGC GAG GGG GCA GTG CAG 1670
2165
560 570
W M N R L I A F A S R G N H V
TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA GGG AAC CAT GTT 1715
2210
580
S P T H Y V P S R S R R F A Q
TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CGG AGA TTC GCC CAG 1760 2255
590 600
A L P V W A R P D Y N P P L V
GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG 1805 2300
610
E T W K K P D Y E P P V V H G
GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAC GGC 1850 2345
620 630
R S S R R F A Q A L P V W A R
AGA TCT TCT CGG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG 1895 2390

FIG. 7E

```
                                        640
 P   D   Y   N   P   P   L   V   E   T   W   K   K   P   D
CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC  1940

                650                                     660
 Y   E   P   P   V   V   H   G   R   K   T   K   R   N   T
TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC  1985

                                    670
 N   R   R   P   Q   D   V   K   F   P   G   G   G   Q   I
AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC  2030

                680                                     690
 V   G   G   V   Y   L   L   P   R   R   G   P   R   L   G
GTT GGT GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA TTG GGT  2075

                                    700
 V   L   A   T   R   K   T   S   P   I   P   K   A   R   R
GTG CTC GCG ACG AGA AAG ACT TCC CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG  2120

                710                                     720
 P   E   G   R   T   W   A   Q   P   G   Y   P   W   P   L
CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC  2165

                                    730
 Y   G   N   K   D   R   R   S   T   G   K   S   W   G   K
TAT GGC AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG GGT AAG  2210

                740                                     750
 P   G   Y   P   W   P   R   K   T   K   R   N   T   N   R
CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC AAC CGG  2255

                                    760
 R   P   Q   D   V   K   F   P   G   G   G   Q   I   V   G
CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC GTT GGT  2300

                770                                     780
 G   V   Y   L   L   P   R   R   G   P   R   L   G   V   L
GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA TTG GGT GTG CTC  2345

                                    790
 A   T   R   K   T   S   P   I   P   K   A   R   R   P   E
GCG ACG AGA AAG ACT TCC CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG CCC GAG  2390
```

FIG. 7E

```
                        800                                                 810
 G   R   T   W   A   Q   P   G   Y   P   W   P   L   Y   G
GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC-  2435

                                        820
 N   K   D   R   R   S   T   G   K   S   W   G   K   P   G
AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG GGT AAG CCA GGG  2480

                    829
 Y   P   W   P   OC
TAC CCT TGG CCC TAA TGAGTCGAC
```

Figura 1

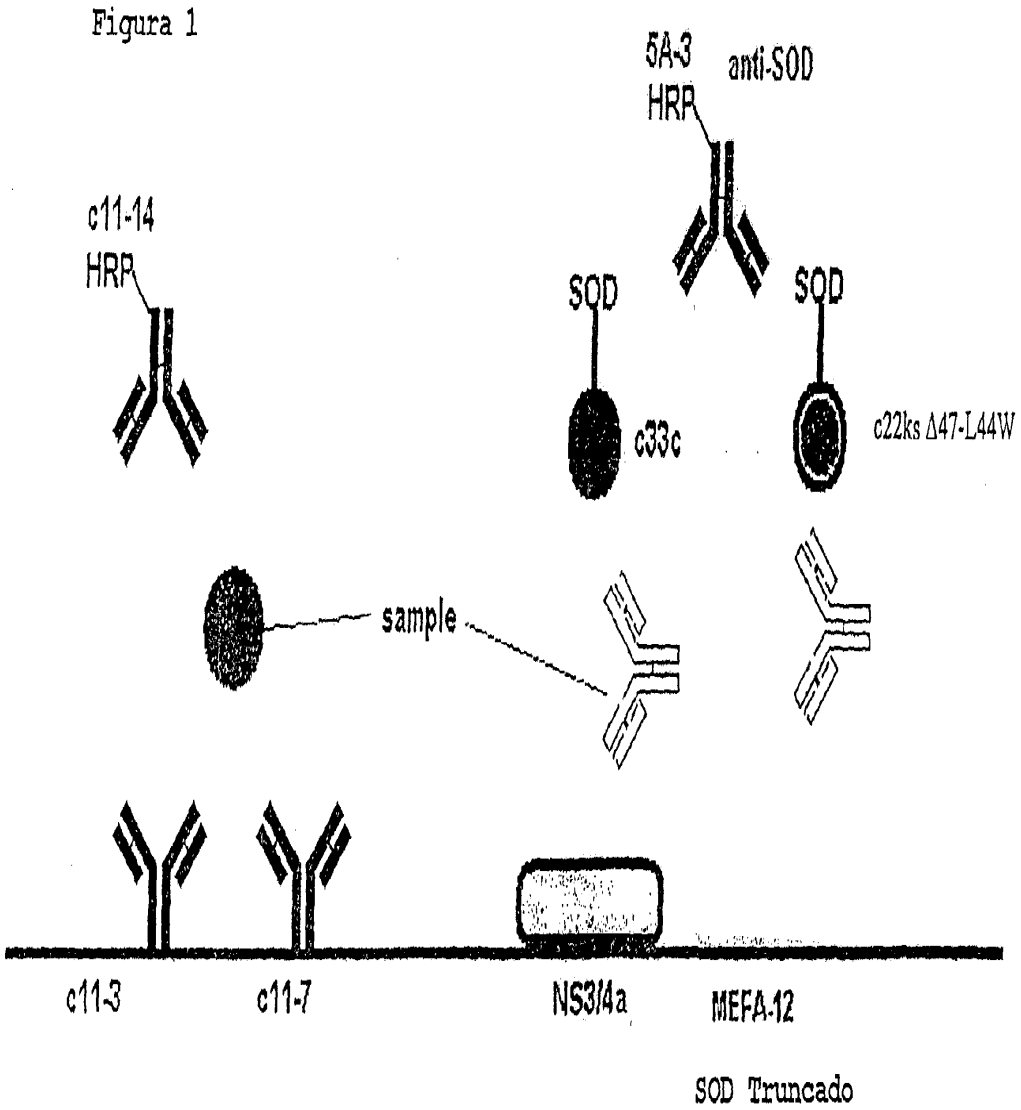


FIG. 8

SUPORTE SÓLIDO DE IMUNOENSAIO, MÉTODOS DE DETECÇÃO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, E DE PRODUÇÃO DE UM SUPORTE SÓLIDO DE IMUNOENSAIO, E, KIT DE TESTE DE IMUNODIAGNÓSTICO

Ensaio de combinação de antígeno de núcleo de HVC anticorpo NS3/4a que pode detectar tanto antígenos de HCV quanto anticorpos presentes em uma amostra usando uma matriz sólida única, que é fornecida, bem como, suportes sólidos de imunoensaio para uso no ensaio.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



99036D57EAD4FB4E

Campo 2



998B7CBC0031C3DA

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 122041e003.txt
- Data de Geração do Código: 09-05-2014
- Hora de Geração do Código: 15:19:38
- Código de Controle:
    - Campo 1: 99036D57EAD4FB4E
    - Campo 2: 998B7CBC0031C3DA