



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

(21) **PI 1003747-0 A2**

(22) Data de Depósito: 16/07/2010  
(43) Data da Publicação: 10/04/2012  
(RPI 2153)



(51) *Int.Cl.:*  
C12N 15/11  
C07H 21/04  
C12Q 1/70

---

**(54) Título:** OLIGONUCLEOTÍDEOS ÚTEIS COMO SONDAS E MÉTODO DE DETECÇÃO E/OU GENOTIPAGEM DE HCV

**(73) Titular(es):** Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**(72) Inventor(es):** Arnaldo Zaha, Cintia Costi, Cláudia Maria Dornelles da Silva, Maria Lucia Rosa Rossetti

**(57) Resumo:** OLIGONUCLEOTÍDEOS ÚTEIS COMO SONDAS E MÉTODO DE DETECÇÃO E/OU GENOTIPAGEM DE HCV. A presente invenção descreve oligonucleotídeos úteis como sondas para hibridização com genoma de HCV, um método para diagnóstico de HCV através da detecção e/ou genotipagem do vírus da Hepatite C (HCV). Em especial, a presente invenção descreve um método qualitativo de detecção e, simultaneamente, de genotipagem de HCV. A presente invenção se situa no campo da química, farmácia e medicina.

### **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

## **OLIGONUCLEOTÍDEOS ÚTEIS COMO SONDAS E MÉTODO DE DETECÇÃO E/OU GENOTIPAGEM DE HCV**

### 5 **Campo da Invenção**

A presente invenção descreve oligonucleotídeos úteis como sondas para hibridização com genoma do vírus da Hepatite C (HCV), um método para diagnóstico de HCV através da detecção e/ou genotipagem do HCV. Em especial, a presente invenção descreve um método qualitativo de detecção e, simultaneamente, de genotipagem do HCV. A presente invenção se situa no campo da química, farmácia e medicina.

### **Antecedentes da Invenção**

O vírus da Hepatite C é uma espécie de vírus do grupo IV (RNA fita simples), da família Flaviviridae, gênero Hepacivirus. Existem vários genótipos deste vírus, sendo que os genótipos de 1 a 7 estão subdivididos em mais de 50 subtipos. É interessante saber que, por sua característica viral, os genótipos do HCV chegam a apresentar de 30% a 50% de diferença no seu RNA.

A presente invenção descreve oligonucleotídeos, método e kit para detecção e/ou genotipagem do vírus da Hepatite C (HCV) através de novas sondas, com alta sensibilidade e baixo custo. Essas novas sondas, métodos e kit são de grande importância para o mercado brasileiro, uma vez que as mesmas foram validadas com pacientes desse país. Em especial, a presente invenção descreve um método qualitativo de detecção e, simultaneamente, de genotipagem do HCV.

No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

O documento US 2007/0065815 descreve um método para genotipagem do HCV compreendendo as etapas de proporcionar um alvo de seqüência nucleotídica enovelada do HCV com duas regiões de fita simples separadas por uma região interveniente de dupla fita; pelo menos uma sonda de

oligonucleotídeos complementar ao alvo; misturar o alvo com o oligonucleotídeo para hibridização; e quantificar a quantidade de complexo alvo/sonda.

5 O documento US 7,473,773 descreve novas composições para determinação de genótipos do HCV compreendendo ensaios de detecção de SNPs na seqüência 5'UTR do HCV.

O documento US 7,157,226 descreve seqüências de genótipos do HCV e seu uso como agente terapêutico e de diagnóstico, especialmente através de um vetor recombinante, método e kit contendo partes da seqüência nucleotídica do HCV.

10 O documento US 5,550,016 descreve oligonucleotídeos recombinantes, primers, sondas, métodos de determinação de genótipos do HCV e método para detectar HCV nas amostras com alta sensibilidade.

15 A presente invenção difere desses documentos pelas sondas serem novas, não descritas no estado da técnica.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

20

### **Sumário da Invenção**

Em um aspecto, a presente invenção proporciona uma alternativa às sondas utilizadas nos testes de identificação e genotipagem do HCV.

25 Elas podem ser utilizadas separadamente ou simultaneamente para detecção qualitativa e genotipagem do HCV.

É um objeto da presente invenção oligonucleotídeos úteis como sondas para hibridização com genoma do HCV compreendendo pelo menos 80% de homologia com as sequencias SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3 e/ou SEQ N4.

30 É objeto adicional da presente invenção o método de diagnóstico do HCV que compreende as seguintes etapas:

a) extração do RNA do HCV de uma amostra.

- b) transcrição reversa do RNA do HCV;
- c) amplificação do material gerado em b) com primers biotinizados;
- d) hibridização do material amplificado utilizando um oligonucleotídeo útil como sonda para hibridização com genoma de HCV, onde o oligonucleotídeo possui pelo menos 80% de similaridade com as sequências SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3 e/ou SEQ N4, e o oligonucleotídeo está em um suporte sólido; e
- e) detecção colorimétrica do genoma hibridizado.

Em uma etapa inicial, é feita a transcrição reversa e amplificação do genoma viral, em fase líquida.

Em uma etapa inicial, as sondas são fixadas em um suporte sólido.

A verificação da detecção e/ou genotipagem do produto amplificado biotinizado é feita por determinação colorimétrica utilizando enzimas que possuem afinidade com a biotina e são capazes de produzir substâncias capazes de serem detectadas colorimetricamente.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

#### **Descrição detalhada da Invenção**

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

A presente invenção apresenta uma série de vantagens em relação àquelas que estão no mercado como, por exemplo: contempla no mesmo teste a detecção qualitativa e a genotipagem do HCV, e isso, por si só, já reduz os custos; foi padronizado com amostras da população brasileira; permite que a leitura dos resultados seja feita em espectrofotômetro, um aparelho comumente utilizado em laboratórios de análises clínicas, o que facilita a aplicação desta técnica em laboratórios de rotina de pequeno porte; não necessita de aparelhos com alto custo, como o seqüenciador de DNA; não necessita de aparelhos

“fechados”, que geralmente são consignados a compra de reagentes para realização de um número pré-determinado de análises/mês.

#### Oligonucleotídeos úteis como sondas para hibridização com genoma do HCV

Na presente invenção, a detecção e/ou genotipagem do HCV é feita  
5 através da hibridização do genoma amplificado utilizando sondas com pelo menos 80% de homologia com as SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3, SEQ N4. As ditas sondas estão fixas em um suporte sólido, como por exemplo uma placa de micropoços.

Em especial, a sonda com pelo menos 80% de homologia com SEQ N1  
10 permite a detecção do HCV de forma qualitativa, ou seja, sendo capaz de reconhecer a presença do HCV da amostra biológica.

As sondas com pelo menos 80% de homologia com SEQ N2, SEQ N3 e/ou SEQ N4 podem ser utilizadas para a genotipagem do HCV, especificamente dos genótipos 1, 2 e 3 do HCV, que são aqueles presentes no  
15 Brasil.

Em uma realização preferencial, as sondas utilizadas possuem 100% de homologia com SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3; SEQ N4. Essas quatro sondas foram desenhadas com base na seqüência do HCV disponível no banco de dados NCBI, utilizando Software Primer Express v2.0 (Applied Biosystems,  
20 Foster City, E.U.A.). Uma amina e um trecho de 10 nucleotídeos 'T' foram adicionados à região final 5' de cada sonda (Invitrogen). A primeira sonda, designada UP (sonda universal – SEQ N1), foi capaz de hibridizar com os sete genótipos, foi utilizada para a detecção do genoma do HCV. As outras três sondas específicas (SP) restantes, designadas SEQ N2, SEQ N3 e SEQ N4,  
25 foram específicos para genótipos 1, 2 e 3, respectivamente.

#### Método Diagnóstico do HCV

A presente invenção apresenta um método de identificação e genotipagem do HCV compreendendo as etapas de:

- a) extração do RNA do HCV de uma amostra.
- 30 b) transcrição reversa do RNA do HCV
- c) amplificação do material gerado em b) com primers biotinilados;

d) hibridização do material amplificado utilizando um oligonucleotídeo útil como sonda para hibridização com genoma de HCV, onde o oligonucleotídeo possui pelo menos 80% de similaridade com as sequências SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3 e/ou SEQ N4, e o oligonucleotídeo está em um suporte sólido; e

e) detecção colorimétrica do genoma hibridizado.

A extração do RNA do HCV na presente invenção utilizou como base a técnica descrita por Boom et al. (1990), com algumas modificações a fim de aumentar a sensibilidade do referido método, tais como: a) diferentes quantidades de plasma (100 µL e 200 µL); b) duas concentrações diferentes do tampão isotiocianato de guanidina, sendo 16 M do tampão original (120 g de GuSCN, 0.1 M de Tris HCl [pH 6.4], 0.2 M de EDTA [pH 8.0] e Triton X-100); 8M tampão modificado (60 g de GuSCN, 0.1 M de Tris HCl [pH 6.4], 0.2 M de EDTA [pH 8.0] e Triton X-100); c) diferentes quantidades da solução de sílica (SiO<sub>2</sub>) (40 µL, 20 µL, 10 µL, 5 µL, 2,5 µL e 1,25 µL).

Em seguida utiliza-se a técnica de RT-PCR (do inglês, *reverse-transcription*) para transformar o RNA em DNA e amplificá-lo, utilizando dois oligonucleotídeos/primers biotinilados. Preferencialmente os primers utilizados são primers degenerados capazes de amplificar um segmento de 260 bp, correspondente a região 5'NCR do HCV. Exemplos preferenciais são HCV2SBio (5'-Biotina-GGAACTWCTGTCTTCACGCRGA-3') e HCV2Abio (5'-Biotina-TCGCAAGCRCCCTATCAGGCAG-3').

As sondas foram dispensadas e aderidas no suporte sólido, como por exemplo, nos poços de microplacas. Os produtos amplificados foram detectados e genotipados simultaneamente nessas microplacas. Cada produto amplificado foi hibridizado separadamente com cada sonda.

Para desenvolvimento de coloração e posterior detecção colorimétrica, foi adicionada aos poços, uma solução compreendendo estreptavidina-peroxidase, seguida da adição de seu substrato que, quando clivado, desenvolve coloração. Quando há hibridização do produto amplificado com a

sonda, há adesão da proteína à biotina e clivagem do substrato pela peroxidase, observando-se assim desenvolvimento da coloração.

### **Exemplo 1. Realização Preferencial**

5 Após a realização dos testes de extração de RNA, o melhor resultado foi verificado com as seguintes condições: 200 µL de plasma, uso de 900 µL de tampão de lise modificado (8M) em associação com 2,5 µL de solução de SiO<sub>2</sub> e 900 µL do tampão de lavagem original.

O protocolo foi o seguinte: 200 µL de plasma foram adicionados a um  
10 tubo eppendorf com 900 µL de tampão de lise contendo 8M de isotiocianato de guanidina e 2,5 µL de uma suspensão de sílica. A mistura foi centrifugada por 15 segundos e incubada por 10 min em temperatura ambiente. Após centrifugação por 1 minuto em 14.000 rpm, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o pellet de sílica foi lavado duas vezes com tampão contendo 8M  
15 de isotiocianato de guanidina, duas vezes com etanol 70% e uma vez com acetona. Os tubos foram colocados em um bloco de aquecimento a 56 °C por 2 minutos, para secar o pellet de sílica. Água tratada com DEPC (50 µL) e RNaseOUT Ribonuclease Inibidor (40 unidades; Invitrogen, Carlsbad, E.U.A.) foram adicionados e pellets foram ressuspensos por agitação em vortex  
20 durante 15 segundos. Após a incubação por 10 minutos a 56 °C e centrifugação por 3 minutos a 13.000 rpm, 47 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo novo e armazenadas a -70 °C

HCV RNA foi reverso transcrito (RT) e amplificado utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) em um único tubo usando o kit One-Step RT-PCR  
25 Platinum kit Taq polimerase (Invitrogen). RT-PCR foi realizada com 10 µL de RNA isolado e 15 pmol de cada um dos primers biotinilado, HCV2SBio (5'-Biotina-GGAACTWCTGTCTTCACGCRGA-3') e HCV2Abio (5'-Biotina-TCGCAAGCRCCCTATCAGGAG-3'), em um volume final de 50 µL. As condições da RT-PCR foram as seguintes: um ciclo a 45°C por 30 minutos para  
30 formação do cDNA; 55 ciclos para a amplificação: 94 °C por 30 segundos; 64°C

por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos; extensão final a 72 °C por 5 minutos e estabilização e parada da reação à 4°C.

Para detecção colorimétrica, foram feitos vários testes: a) diferentes quantidades de cada uma das quatro sondas (100 ng e 200 ng), temperaturas de hibridização 50 e 55°C, tempo de incubação com o substrato TMB (10 e 15 minutos). As melhores condições estão descritas a baixo.

Cem nanogramas das sondas SEQ N1, SEQ N3, SEQ N4 e 200 ng para SEQ N2 foram dissolvidas em 100 µL de tampão de imobilização (100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,6) e dispensados nos poços das microplacas. A microplaca foi selada com um adesivo (HotSeal, Diversified Biotech, Boston, E.U.A.) e incubada overnight 2-8° C. As sondas foram removidas e os poços foram lavados três vezes com PBS contendo 0,05 % Tween-20.

Os produtos amplificados foram detectados e genotipados simultaneamente em microplacas (Immobilizer Amino Surface, Nunc, Roskilde, Dinamarca). Cada produto amplificado foi hibridizado separadamente com cada sonda: SEQ N1, SEQ N2 SEQ N3 e SEQ N4. Em cada poço foram adicionados 100 µL de Solução de Hibridização (SSC 5x, 0,5% BSA, 0,1% Tween 20) e 9,5 µL do produto amplificado, previamente desnaturado a 100° C durante 5 minutos e refrigeradas em gelo. As amostras foram incubadas por 45 minutos a 50° C para que a hibridização fosse realizada. Os poços foram lavados 3 vezes com uma Solução de SSC5x/0,1% Tween-20, incubados à 50 °C por 15 minutos com a mesma solução previamente aquecida e, novamente lavados 3 vezes. Para desenvolvimento de coloração, foi adicionada aos poços, a Solução de Estreptavidina-peroxidase 0,4 µg/mL (tampão MOPS 0,1M pH 7,4, 30mg/mL de BSA fração V, 20mg/mL de manitol, 60mg/mL de sacarose, CaCl<sub>2</sub> 1mM, 0,2 mg/mL de timerosal e 0,4 µg/mL de Polímero de Estreptavidina-Peroxidase – Sigma, Saint Louis, USA) e incubado por 30 minutos à 37°C.

Os poços foram lavados três vezes com uma Solução Salina Tampão de Tris (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20), incubados por 5 minutos à temperatura ambiente com esta solução e lavados por mais 3 vezes com a mesma solução. Foi adicionado o substrato da enzima, o TMB (3,3',5,5'-

tetrametilbenzidina) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. Nessa etapa, quando houve hibridização do produto amplificado com a sonda, foi observado o desenvolvimento da coloração. Então foi adicionada a solução de parada (0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a absorbância foi avaliada em 450nm com refiltro de  
5 620nm em leitora de ELISA.

A sensibilidade analítica, ou melhor, o limite mínimo de detecção do método proposto foi 50 UI/mL de RNA do HCV. Entre as 85 amostras de plasma analisadas, a sensibilidade e especificidade do método proposto para detecção do RNA viral, quando comparado com Cobas Amplicor HCV Assay v2.0, foram  
10 de 100% (95% IC; 92,75% - 100%) e de 97,2% (95% IC; 85,48% - 100%), respectivamente. Os valores preditivo positivo e preditivo negativo foram de 98% (95% IC; 89,36% - 99,95%) e de 100% (95% IC; 90,01% - 100%), respectivamente. O Kappa encontrado foi de 0,976 ( $p < 0,001$ ), mostrando alto grau de concordância entre os dois métodos de detecção qualitativa. Para  
15 genotipagem do HCV, pôde-se observar 97,22% (35/36) de concordância entre o método proposto e o seqüenciamento de DNA. O Kappa encontrado foi de 0,976 ( $p < 0,001$ ), mostrando alto grau de concordância entre os dois métodos de genotipagem. Sendo assim, o método proposto apresentou bons resultados de sensibilidade e especificidade, com alto grau de concordância com os  
20 métodos de referência, tanto para detecção qualitativa, como para genotipagem do HCV.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Listagem de Seqüências

<110>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul	
<120>	Oligonucleotídeos e Método de Detecção e/ou Genotipagem de HCV	
<210>	1	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<221>	OLIGONUCLEOTÍDEO	
<222>	(1)...(28)	
<400>	1	
	5'- amina-ttttttttgggagagccatagtggtc – 3'	28
<210>	2	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<221>	OLIGONUCLEOTÍDEO	
<222>	(1)...(26)	
<400>	2	
	5'- amina-ttttttttaattgccaggacgacc – 3'	26
<210>	3	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<221>	OLIGONUCLEOTÍDEO	
<222>	(1)...(25)	
<400>	3	
	5'- amina-ttttttttcggtgggtgcgaaa – 3'	25
<210>	4	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<221>	OLIGONUCLEOTÍDEO	
<222>	(1)...(31)	
<400>	4	
	5'- amina-ttttttttgatcactagccgagtagtgg – 3'	31

### Reivindicações

#### OLIGONUCLEOTÍDEOS ÚTEIS COMO SONDAS E MÉTODO DE DETECÇÃO E/OU GENOTIPAGEM DE HCV

- 5           1. Oligonucleotídeos úteis como sondas caracterizados por compreenderem pelo menos 80% de similaridade com uma sequência escolhida do grupo que compreende SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3 e/ou SEQ N4.
2. Oligonucleotídeos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por adicionalmente compreenderem uma amina.
- 10           3. Método de detecção e genotipagem de HCV caracterizado por compreender as etapas de:
- a) extração do RNA do HCV de uma amostra.
- b) transcrição reversa do RNA do HCV
- c) amplificação do material gerado em b) com primers biotinizados;
- 15           d) hibridização do material amplificado utilizando um oligonucleotídeo útil como sonda para hibridização com genoma de HCV, onde o oligonucleotídeo possui pelo menos 80% de similaridade com as sequências SEQ N1, SEQ N2, SEQ N3 e/ou SEQ N4, e o oligonucleotídeo está em um suporte sólido; e
- 20           e) detecção colorimétrica do genoma hibridizado.
4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo primer biotinizado ser um primer degenerado capaz de amplificar um segmento de 260 bp, correspondente a região 5'NCR do HCV.
5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo primer ser 5'-Biotina-GGAACTWCTGTCTTCACGCRGA-3' e/ou 5'-Biotina-TCGCAAGCRCCCTATCAGGCAG-3'.
- 25           6. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela detecção de todos os genótipos do HCV ser detectado pelo oligonucleotídeo com pelo menos 80% de similaridade com SEQ N1.

7. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela detecção de todos os genótipos 1, 2 e 3 do HCV serem detectados respectivamente pelos oligonucleotídeos com pelo menos 80% de homologia com SEQ N2, SEQ N3 e SEQ N4.

5           8. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelas etapas b) e c) ocorrerem em fase líquida.

9. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela determinação colorimétrica compreender as etapas de:

a) adição de estreptavidina-peroxidase aos poços da microplaca;

10          b) adição de substrato que, quando clivado, gera produto detectável colorimetricamente; e

c) determinação do produto detectável colorimetricamente.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo substrato ser 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

**Resumo****OLIGONUCLEOTÍDEOS ÚTEIS COMO SONDAS E MÉTODO DE DETECÇÃO  
E/OU GENOTIPAGEM DE HCV**

5           A presente invenção descreve oligonucleotídeos úteis como sondas para  
hibridização com genoma de HCV, um método para diagnóstico de HCV  
através da detecção e/ou genotipagem do vírus da Hepatite C (HCV). Em  
especial, a presente invenção descreve um método qualitativo de detecção e,  
simultaneamente, de genotipagem de HCV. A presente invenção se situa no  
10 campo da química, farmácia e medicina.