



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

(11) PI 9815090-1 B1

(22) Data do Depósito: 18/12/1998

(45) Data de Concessão: 10/05/2016
(RPI 2366)



(54) Título: VETOR COMPREENDENDO UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANDO UM ANTÍGENO RHESUS D FRACO, BACTÉRIA OU LEVEDURA COMPREENDENDO O MESMO, BEM COMO PROCESSOS DE PRODUÇÃO DO REFERIDO ANTÍGENO, PARA TESTAR A PRESENÇA DE TAL MOLÉCULA, PARA A CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS OU ANTI-SORO, IDENTIFICAÇÃO DE CADEIAS VH OU VL OU DE UM ANTICORPO, DE AVALIAÇÃO DE AFINIDADE, AVIDEZ E/OU REATIVIDADE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-D OU DE ANTISSORO POLICLONAL ANTI-D OU DE ANTIGLOBULINA OU DE ANTISSORO ANTIGLOBULINA-HUMANA, USO DO REFERÍDO ÁCIDO NUCLEICO E KIT

(51) Int.Cl.: C12N 15/12; C07K 14/47; C12Q 1/68; C07K 16/18; G01N 33/566

(30) Prioridade Unionista: 23/01/1998 EP 98 10 1203.2

(73) Titular(es): DRK-BLUTSPENDEDIENST BADEN-WÜRTTEMBERG-HESSEN GEMEINNÜTZIGE GMBH

(72) Inventor(es): WILLY A. FLEGEL, FRANZ F. WAGNER

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VETOR COMPREENDENDO UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANDO UM ANTÍGENO RHESUS D FRACO, BACTÉRIA OU LEVEDURA COMPREENDENDO O MESMO, BEM COMO PROCESSOS DE PRODUÇÃO**
5 **DO REFERIDO ANTÍGENO, PARA TESTAR A PRESENÇA DE TAL MOLÉCULA, PARA A CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS OU ANTISORO, IDENTIFICAÇÃO DE CADEIAS V_H OU V_L OU DE UM ANTICORPO, DE AVALIAÇÃO DE AFINIDADE, AVIDEZ E/OU REATIVIDADE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-D OU DE ANTISSORO POLICLONAL**
10 **ANTI-D OU DE ANTIGLOBULINA OU DE ANTISSORO ANTIGLOBULINA-HUMANA, USO DO REFERÍDO ÁCIDO NUCLEICO E KIT".**

A presente invenção refere-se a novas moléculas de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para o fenótipo D fraco que são caracterizadas por uma, ou uma combinação de mutações de
15 sentido errado ou por uma conversão de genes envolvendo 6 a 9 exons dos genes *RHD* e *RHCE*. A presente invenção refere-se, além disso, a vetores compreendendo as moléculas de ácido nucléico da invenção, a hospedeiros transformados com referidos vetores, a proteínas codificadas por referidas moléculas de ácido nucléico e a processos para produzir estes polipeptí-
20 deos. O fato de que mutações de sentido errado e a conversão referida acima poder ser diretamente correlacionada ao fenótipo D fraco tem um impacto significativo nos testes de rotina de amostras de sangue. Por exemplo, oligonucleotídeos e anticorpos podem agora ser designados, que geralmente permitem a detecção de fenótipos D fraco em uma amostra. Tais oligonucle-
25 otídeos, anticorpos bem como uma variedade de processos de diagnóstico estão todos dentro do escopo da presente invenção. Antígenos RhD codificados pelas novas moléculas de ácido nucléico podem ser usados para a caracterização, padronização e controle de qualidade de anti-soros monoclonais e policlonais. Finalmente, a invenção refere-se a um kit utilizável para
30 testar a presença de fenótipos D fraco.

O antígeno Rhesus D (ISBT 004.001; RH1) transportado pela proteína de RhD é o antígeno de grupo sanguíneo mais importante determi-

nado por uma proteína. Ele é ainda a causa principal para a doença hemolítica de recém-nascidos (Mollison et al., 1993). Cerca de 0,2% a 1% dos brancos têm glóbulos vermelhos com uma expressão reduzida do antígeno D (D fraco, anteriormente D^u) (Mourant et al., 1976; Stratton, 1946; Wagner et al., 1995). Uma fração pequena de amostras de D fraco é explicada por proteínas RhD qualitativamente alteradas, denominada D parcial (Salmon et al., 1984) e causada freqüentemente por alelos híbridos de *RHD/RHCE* (estudado recentemente em Huang, 1997). Outra fração é causada pelos

efeitos supressivos de haplótipos C na posição trans (Ceppellini et al., 1955). Este D fraco possui provavelmente o alelo de *RHD* normal, porque os pais e crianças portadoras expressam freqüentemente uma densidade de antígeno RhD normal. Este D fraco mostra somente uma redução menor da expressão do antígeno RhD, foi livremente denominado "D de grau alto" e representado atualmente freqüentemente como RhD normal, devido à sensibilidade aumentada dos anticorpos anti-D monoclonais.

A maior parte de antígeno D moderadamente a fortemente enfraquecido é devido a genótipo (s) localizados tanto ao local do gene Rhesus por si mesmo ou próximo, porque a expressão de D fraco é herdada junto com o fenótipo RhD (Stratton, 1946). Além da mera redução quantitativa, nenhuma diferença qualitativa pode ser discernida no antígeno RhD deste tipo mais predominante de D fraco. Dois estudos recentes descrevem a causa molecular dos fenótipos D fraco predominantes. Ambos os grupos, Rouillac et al. (1996) e Beckers et al. (1997), realizaram RT-PCR e encontraram nenhuma mutação quando da seqüenciamento de cDNA de *RHD* em amostras de D fraco. Usando RT-PCR semi-quantitativo, Rouillac et al. (1996) descreveram níveis no estado estável reduzidos de transcritos de *RHD* em amostras de D fraco e descreveram, que suas observações deram evidência direta de uma diferença somente quantitativa em RhD entre células do sangue vermelho de D fraco. Em uma abordagem similar, Beckers et al. (1995 e 1997), no entanto, não encontraram nenhuma diferença nas quantidades de transcritos de *RHD* e excluíram um excesso de variantes splice (Kajii et al., 1995), cujos produtos podem ser inadequadamente ou não no todo incorporados na membrana de glóbulos vermelhos (Beckers et al., 1997). Eles concluíram que D fraco não é causado por defeitos regulatórios do processo de transcrição e propuseram genes regulatórios não-identificados ou fatores envolvidos no complexo relacionado a Rh como causa possíveis de D fraco. Conseqüentemente, apesar do mecanismo da expressão de D fraco permanecer equívoco, nenhuma causa molecular foi estabelecida.

Triagem de amostras de D fraco aleatórias por PCR para polimorfismos específicos de *RHD* confirmou padrões de amplificação de PCR

representativos para um alelo de *RHD* normal (Avent et al., 1997b; Legler et al., 1997). No entanto, evidência foi se acumulando que D muito pouco fraco não consegue representar D parcial, pode transportar alelos de *RHD* estruturalmente anormais: Quatro de 44 D fraco na Inglaterra necessitados de 4
 5 construções amplificadas de PCR de íntron específico RHD (Avent e colaboradores, 1997b) e um de 94 D fraco no Norte da Alemanha necessitado de 5 construções amplificadas de PCR de exon específico RHD (Legler e colaboradores, 1997). Na última amostra, o nucleotídeo T na posição 667 foi substituído pela codificação G específica de *RHCE* para uma substituição do
 10 aminoácido F223V (TJ Legler e A Humpe, personal communications).

Assim, alelos aberrantes foram observados somente em uma fração pequena de fenótipos D fraco dando a possibilidade improvável de que estas trocas no nível molecular foram certamente responsáveis pelo fenômeno geral do fenótipo D fraco; ver também Aubin et al., 1997; Avent et
 15 al., 1997b; Fukumori et al., 1997; Huang, 1997; Issitt e Telen, 1996; Roubinet et al., 1996. Conseqüentemente, a técnica anterior combinada falhou em prover até agora um meio convenientemente aplicável e seguro para detectar o fenótipo Rhesus D fraco em uma amostra.

Conseqüentemente, o problema técnico subjacente à presente
 20 invenção foi estabelecer um meio bem como processos que podem, convenientemente e amplamente, ser empregados na análise do fenótipo fraco Rhesus D.

A solução para referido problema técnico é obtida provendo as formas de realização caracterizadas nas reivindicações. Assim, a presente
 25 invenção refere-se a uma molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo de fenótipo D fraco, referida molécula de ácido nucléico transportando pelo menos uma mutação de sentido errado, como comparado ao antígeno Rhesus D do tipo selvagem, em suas regiões de transmembrana e/ou intracelular.

30 De acordo com a presente invenção, o termo "contribuindo para o fenótipo D fraco" implica um papel ativo da mutação que pode ser causada por uma troca de aminoácidos, enquanto o termo "indicativo de fenótipo

fraco" não implica necessariamente este papel, mas pode se referir também a uma mutação silenciosa. Uma mutação silenciosa pode ocorrer, por exemplo, em conjunto com outras mutações como mutações de sentido errado que são descritas em mais detalhe abaixo.

5 De acordo com a presente invenção, verificou-se que as muta-
ções de sentido errado observadas não estão somente associadas com,
mas realmente causaram uma integração de proteína de RhD reduzida nas
membranas de glóbulos vermelhos. Assim, pela presente invenção de-
monstra-se que (i) alelos de D fraco evoluem independentemente nos ha-
10 plótipos diferentes, cada caso distinto estando associado com uma troca na
seqüência de codificação de RhD; (ii) nenhuma amostra ocorreu com a se-
qüência de codificação normal a despeito da observação de 16 alelos dife-
rentes em 164 amostras; e (iii) tipo e distribuição das substituições de nu-
cleotídeos observadas não foi compatível com a hipótese nula de trocas
15 aleatórias.

A descoberta de que mutações de sentido errado em *RHD* le-
vam a expressão de antígeno D reduzida, ajustada no modelo atual de inte-
gração de membrana RhD; ver tabela 7. Ambas as proteínas Rh ocorrem em
um complexo com a proteína Rh50, que pode ser unida por várias proteínas
20 adicionais, como LW, CD47 e glicoforin B (Huang, 1997). A expressão do
complexo de Rh total na integridade de pelo menos uma proteína Rh (JP
Cartron, apresentação oral na conferência ISBT/DGTI, Frankfurt, setembro,
1997) e a proteína Rh50 (Cherif-Zahar et al., 1996). Trocas estruturais sutis
na proteína Rh50 causadas por mutações de sentido errado são suficientes
25 para evitar a expressão do complexo de Rh (Cherif-Zahar et al., 1996). Do
mesmo modo, estas trocas estruturais sutis na proteína de RhD parecem
também afetar a expressão do complexo de Rh envolvendo RhD.

Baseado na distribuição e espécie de substituições de aminoá-
cidos, uma descrição geral da relação da estrutura de RhD e expressão de
30 RhD pode agora ser estabelecida: Todas as substituições de aminoácidos
em D fraco estão localizadas nas partes intracelulares e de transmembrana
da proteína de RhD onde o alinhamento foi realizado de acordo com o mo-

delo atual acima mencionado (ver tabela 7). Alelos de RhD conhecidos com substituições exofaciais (Avent et al., 1997a; Jones et al., 1997; Liu et al., 1996; Rouillac et al., 1995) foram descobertos em virtude de seu antígeno D parcial, mas podem exibir reduções discretas (D^{NU} e D^{VII}) a moderadas (D^{II} , DHR e DHMi) na expressão de RhD (Flegel e Wagner, 1996; Jones et al., 1997; Jones et al., 1996). A maior parte das substituições descritas de acordo com esta invenção foram não-conservativas e os aminoácidos introduzidos, em particular prolina, provavelmente romperam a estrutura secundária ou terciária. Dois alelos de D fraco (tipo 2 e 11) foram associados com substituições conservativas, indicando que as regiões de aminoácidos envolvidas nas posições 295 e 385 foram muito importantes para uma integração de membrana RhD ótima. Em dois alelos (tipo 4 e tipo 14), partes de 4 e 5 exons foram substituídas pelas partes correspondentes do gene *RHCE*. Trocas similares ocorreram em D^{VI} tipo I e D^{VI} tipo II que demonstraram uma expressão da proteína de RhD consideravelmente reduzida (Jones et al., 1996), também. Observações paradoxais anteriores podem ser explicadas se a substituição N152T no exon 3 é considerada facilitar a integração de membrana: (i) D^{IIIa} (Huang et al., 1997), diferindo de D fraco tipo 4 pela substituição N152T somente, tem uma densidade do antígeno RhD normal (Jones et al., 1996), e (ii) D^{IIIc} , D^{IVa} e D^{VI} tipo III abrigando a substituição N152T têm densidades de antígeno melhoradas (Flegel et al., 1997; Jones et al., 1996) comparado a seus controles apropriados (RHD normal e D^{VI} tipo II).

Vários fenótipos com expressão de D fraco, como D^{VI} , D^V , DBT, algum D^{IV} e DFR, foram reconhecidos há muito tempo como entidades separadas por sua propensão do portador para produzir anti-D (Lomas et al., 1994; Tippett e Sanger, 1977; Tippett e Sanger, 1962). Estes fenótipos foram subsequentelemente confirmados e agrupados por padrões de reação distintos com anti-D monoclonal (Lomas et al., 1993; Lomas et al., 1989; Scott, 1996). Uma classificação serológica da maior parte dos fenótipos D fraco, no entanto, não foi bem-sucedida, porque eles eram desprovidos de um padrão de reação consistente com anti-D monoclonal e seus portadores

pareciam não propensos à imunização anti-D (Moore, 1984). Não houve ainda nenhum limite definido entre D normal e D fraco (Agre et al., 1992; Moore, 1984; Nelson et al., 1995). Contudo, variabilidade da densidade do antígeno RhD (antígenos por célula) em fenótipos D fraco (Hasekura et al., 1990; Jones et al., 1996; Nelson et al., 1995; Nicholson et al., 1991; Tazzari et al., 1994; Wagner, 1994) e padrões aberrantes raros em PCR *RHD* (Avent et al., 1997b; Legler et al., 1997) não excluem uma diversidade molecular subjacente. A presente invenção pela primeira vez permite a classificação conveniente de D fraco e para a correlação não-ambígua de alelos distintos com dado clínico. Em conjunto com alelos de *RHD* raros anteriormente definidos, a definição molecular exata da maior parte dos fenótipos com densidade do antígeno D reduzida torna-se agora possível. No caso em que pacientes transportando tipos moleculares particulares de D fraco eram propensos a desenvolver anti-D, a classificação tornada possível pela presente invenção ajudará a guiar um programa de transfusão negativa de Rhesus. A disponibilidade de amostras de D fraco que são caracterizadas com respeito à estrutura molecular e densidades do antígeno RhD promoverá a segurança da qualidade de reagentes anti-D. Eles devem de modo confiável ser do tipo probrandas como RhD positivo, cujas proteínas RhD não são propensas a imunização anti-D freqüente (Wagner et al., 1995). Conseqüentemente, o uso de unidades de células do sangue vermelho RhD negativas para transfusões em pacientes com D fraco, que foi justificado por um potencial presumido para imunização anti-D, pode, finalmente, ser reduzido a um mínimo, que pode ser cientificamente reduzido.

Alternativamente, verificou-se, de acordo com a invenção, que as mutações agrupam-se em certas extensões do polipeptídeo Rhesus D. Além disso, detectou-se uma conversão de gene correlacionando com o fenótipo D fraco. Assim, a invenção refere-se também a uma molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo de fenótipo D fraco, referida molécula de ácido nucléico

(a) transportando pelo menos uma mutação de sentido errado, como comparado ao antígeno Rhesus D do tipo selvagem, nas posições de

aminoácidos 2-16, 114-149, 179-225 ou/e 267 a 397, com a condição de que referido antígeno D não transporte uma mutação de sentido errado única levando a uma substituição de fenilalanina na posição de aminoácidos 223 por valina ou treonina na posição 283 por isoleucina; ou

- 5 (b) transportando uma conversão de gene envolvendo 6 a 9 exons que são substituídos pelos exons correspondentes do gene *RHCE*.

Todas as mutações de sentido errado encontradas de acordo com a presente invenção e localizadas nas regiões acima estão associadas com a região de transmembrana ou a porção intracelular do polipeptídeo
10 quando o modelo atual acima indicado de RhD é empregado. No entanto, quando modelos diferentes são empregados, as mutações associadas com o fenótipo D fraco podem também ser encontradas nas regiões extracelulares. As regiões acima compreendem também posições de aminoácidos que estão localizadas nas regiões extracelulares quando o modelo atual é apli-
15 cado. Referidas posições também podem ser as que sofreram mutações e correlacionáveis com o fenótipo D fraco. Estas mutações estão também dentro do escopo do pedido.

Além das mutações de sentido errado, uma conversão de gene indicativa de D fraco foi identificada. Referida conversão pode ser usada
20 para fins de diagnóstico basicamente na mesma extensão que as mutações de sentido errado. De acordo com a invenção, os pontos de ruptura são determinados ser introns 5 e 9: ver também figura 3.

Os mutantes acima referidos, e ainda por todo este relatório, podem ser empregados convenientemente para a caracterização de anti-
25 corpos monoclonais e policlonais usados em conexão com diagnóstico, profilaxia e tratamento de RhD. Por exemplo, expressando moléculas de ácido nucléico desejadas codificando estes mutantes em um sistema apropriado, perfis de reatividade de referidos anticorpos ou anti-soros podem ser estabelecidos. Os mutantes também podem ser empregados para a caracterização
30 de anticorpos monoclonais e policlonais que são usados como anticorpos secundários, por exemplo, anti-soros antiglobulina e antiglobulina-humana.

Preferivelmente, a mutação de sentido errado causa uma subs-

tituição de aminoácidos na posição 3, 10, 16, 114, 149, 182, 198, 201, 220, 223, 270, 276, 277, 282, 294, 295, 307, 339, 385 ou 393 ou uma combinação de/ou envolvendo referidas substituições.

Esta forma de realização preferida, além das mutações únicas indicadas, pode compreender uma combinação destas substituições. Adicionalmente, contempla-se a possibilidade de que uma ou mais de referidas substituições estejam envolvidas, e mutações adicionais como mutações levando a substituições estão presentes. De acordo com a presente invenção, entende-se que tais mutações adicionais podem ser testadas quando avaliando o estado de RhD em uma amostra. Uma descoberta desta mutação permitirá ao versado na técnica concluir que outras mutações identificadas neste relatório, ocorrendo em combinação com referida primeira mutação, estarão presentes. Conseqüentemente, as formas de realização refletindo a detecção de mutações adicionais ocorrendo em combinação com as mutações identificadas neste relatório estão também compreendidas pela invenção.

Em uma forma de realização particularmente preferida da molécula de ácido nucléico da invenção, referida substituição de aminoácidos na posição 3 é de Ser para Cys, na posição 10 de Arg para Gln, na posição 16 de Trp para Cys, na posição 114 de Arg para Trp, na posição 149 de Ala para Asp, na posição 182 de Ser para Thr, na posição 198 de Lys para Asn, na posição 201 de Thr para Arg, na posição 220 de Trp para Arg, na posição 223 de Phe para Val, na posição 270 de Val para Gly, na posição 276 de Ala para Pro, na posição 227 de Gly para Glu, na posição 282 de Gly para Asp, na posição 294 de Ala para Pro, na posição 295 de Met para Ile, na posição 307 de Gly para Arg, na posição 339 de Gly para Glu, na posição 385 de Gly para Ala e na posição 393 de Trp para Arg.

Em uma outra forma de realização preferida da molécula de ácido nucléico da invenção, referida mutação de sentido errado ocorre nas posições de nucleotídeo 8, 29, 48, 340, 446, 544, 594, 602, 658, 667, 809, 819, 826, 830, 845, 880, 885, 919, 1016, 1154 e 1177 ou em uma combinação de referidas posições.

Particularmente preferido é que referida mutação de sentido errado na posição 8 é de C para G, na posição 29 de G para A, na posição 48 de G para C, na posição 340 de C para T, na posição 446 de C para A, na posição 544 de T para A, na posição 594 de A para T, na posição 602 de C para G, na posição 658 de T para C, na posição 667 de T para G, na posição 809 de T para G, na posição 819 de G para A, na posição 826 de G para C, na posição 830 de G para A, na posição 845 de G para A, na posição 880 de G para C, na posição 885 de G para T, na posição 919 de G para A, na posição 1016 de G para A, na posição 1154 de G para C e na posição 1177 de T para C.

No caso em que combinações de mutações de sentido errado estão envolvidas na geração de fenótipos D fraco, prefere-se que referida combinação de substituições esteja nas posições 182, 198 e 201 e é, preferivelmente, S182T, K198N, T201R ou na posição 201 e 223 e é, preferivelmente, T201R e F223V, ou na posição 16, 201 e 223, e é preferivelmente W16C, T201R e F223V.

Mais preferivelmente, referida combinação de mutações de sentido errado compreende posições 544, 594 e 602 e é, preferivelmente T → A na posição 544, A → T na posição 594 e C → G na posição 602 ou compreende posições 602, 667 e 819 e é, preferivelmente, C → G na posição 602, T → G na posição 667 e G → A na posição 819, ou compreende posições 48, 602, 667 e 819 e é, preferivelmente, G → C na posição 48, C → G na posição 602, T → V na posição 667 e G → A na posição 819.

Apesar da molécula de ácido nucléico da invenção poder ser de várias origens, incluindo origem (semi) sintética, prefere-se que a molécula de ácido nucléico seja mRNA ou DNA genômico. Procedimentos padrões podem ser empregados para obter quaisquer dos ácidos nucléicos acima; ver, por exemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª ed., 1989. CSH Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

A invenção refere-se, também, a um vetor compreendendo a molécula de ácido nucléico da invenção.

O vetor pode ser usado para propagação e/ou expressão ou

pode ser designado para transferência de gene ou fins de marcação. Processos para produzir tais vetores são bem conhecidos na técnica. O mesmo se mantém verdadeiro para clonar os ácidos nucleicos da mutação em referidos vetores, bem como a propagação de vetores em hospedeiros apropriados, etc.

O vetor pode, particularmente, ser um plasmídeo, um cosmídeo, um vírus ou um bacteriófago usado convenientemente em engenharia genética que compreende a molécula de ácido nucleico da invenção. Vetores de expressão derivados de vírus como retrovírus, vírus vacínia, vírus adeno associados, vírus do herpes ou vírus de papiloma bovino, podem ser usados para liberação das moléculas de ácido nucleico ou vetor da invenção em populações de células marcadas. Processos que são bem conhecidos dos versados na técnica podem ser usados para construir vetores virais recombinantes; ver, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. e Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). Alternativamente, os polinucleotídeos e vetores da invenção podem ser reconstituídos em lipossomas para liberar células de marcação. Os vetores contendo as moléculas de ácido nucleico da invenção podem ser transferidos em célula hospedeira por processos bem conhecidos, que variam dependendo do tipo de hospedeiro celular. Por exemplo, transfecção de cloreto de cálcio é comumente utilizada para células procarióticas, enquanto tratamento com fosfato de cálcio ou eletroporação pode ser usado para outros hospedeiros celulares; ver Sambrook, supra.

Estes vetores podem compreender ainda genes como genes marcadores que permitem a seleção de referido vetor em uma célula hospedeira apropriada e em condições apropriadas. Preferivelmente, a molécula de ácido nucleico da invenção é ligada operativamente a sequência de controle de expressão permitindo expressão em células procarióticas ou eucarióticas. Expressão de referido polinucleotídeo compreende transcrição do polinucleotídeo em um mRNA traduzível. Elementos regulatórios assegu-

rando expressão em células eucarióticas, preferivelmente células de mamíferos, são bem conhecidos dos versados na técnica. Eles compreendem geralmente seqüências regulatórias assegurando início de transcrição e, opcionalmente, sinais poli-A assegurando terminação de transcrição e estabilização do transcrito. Elementos regulatórios adicionais podem incluir melhoradores transcripcionais bem como translacionais, e/ou regiões de promotor heterólogas ou associadas naturalmente. Elementos regulatórios possíveis permitindo expressão em células hospedeiras procarióticas compreendem, por exemplo, o promotor PL, lac, trp ou tac em *E. coli*, e exemplos de elementos regulatórios permitindo expressão em células hospedeiras eucarióticas são o promotor AOX1 ou GAL1 em levedura ou o promotor CMV, SV40, RSV-promotor (vírus de sarcoma Rous), melhorador de CMV, melhorador de SV40 ou um íntron globina em células de mamífero e outras células de animal. Ao lado de elementos que são responsáveis pelo início de transcrição, estes elementos regulatórios também podem compreender sinais de terminação de transcrição, como o sítio SV40-poli-A ou o sítio tk-poli-A, a jusante da molécula de ácido nucléico. Além do mais, dependendo do sistema de expressão usado, seqüências líderes capazes de dirigir o polipeptídeo a um compartimento celular ou secretar o mesmo no meio, podem ser adicionadas à seqüência de codificação do polinucleotídeo da invenção e são bem conhecidas na técnica. A(s) seqüência(s) líder (es) é (são) reunidas na fase apropriada com seqüências de tradução, iniciação e terminação e, preferivelmente, uma seqüência líder capaz de dirigir secreção da proteína traduzida, ou uma porção da mesma, no espaço periplásmico ou meio extracelular. Opcionalmente, a seqüência heteróloga pode codificar uma proteína de fusão incluindo um peptídeo de identificação C- ou N-terminal conferindo características desejadas, por exemplo, estabilização ou purificação simplificada do produto recombinante expressado. Neste contexto, vetores de expressão apropriados são conhecidos na técnica como vetor de expressão pcDV1 Okayama-Berg (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-vitrogene), ou pSPORT1 (GIBCO BRL).

Preferivelmente, as seqüências de controle de expressão serão

sistemas de promotor eucarióticos em vetores capazes de transformar ou transfectar células hospedeiras eucarióticas, mas seqüências de controle para hospedeiros eucarióticos também podem ser usadas.

Como acima mencionado, o vetor da presente invenção também
5 pode ser um vetor de marcação ou de transferência de gene. Terapia genética, que é baseada em introduzir genes terapêuticos em células por técnicas *ex-vivo* ou *in-vivo* é uma das aplicações mais importantes de transferência de gene. Processos e vetores apropriados para terapia genética *in vitro* ou *in vivo* são descritos na literatura e são conhecidos dos versados na técnica;
10 ver, por exemplo, Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957 ou Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640, e referências
15 ali citadas. Os polinucleotídeos e vetores da invenção podem ser designados para introdução direta ou para introdução via lipossomas, ou vetores virais (por exemplo, adenovírus, retrovírus) na célula. Preferivelmente, referida célula é uma célula de linhagem de germe, célula embriônica, ou célula de ovo ou derivada do mesmo, mais preferivelmente referida célula é uma célula indiferenciada.
20

Adicionalmente, a invenção refere-se a um hospedeiro transformado com o vetor da invenção.

Hospedeiros apropriados compreendem animais transgênicos, células como bactérias, células de levedura, animais preferivelmente células
25 de mamífero, células fúngicas ou células de inseto. Protocolos de transformação, incluindo transfecção, microinjeção, eletroporação, etc., também são bem conhecidos na técnica.

Além disso, a invenção refere-se a um processo para produzir um antígeno Rhesus D contribuindo para o fenótipo D fraco compreendendo
30 cultivar o hospedeiro da invenção em condições apropriadas e isolar o antígeno Rhesus D produzido.

Prefere-se que o antígeno seja exportado no meio de cultura

onde pode ser coletado de acordo com convenções/processos. O termo "cultivar", como usado de acordo com a presente invenção, compreende também o aumento de animais transgênicos. Usando construções de vetores apropriados e, opcionalmente, rações apropriadas, o antígeno pode, por exemplo, ser isolado de leite, por exemplo, de vacas transgênicas.

A invenção refere-se adicionalmente a antígeno Rhesus D codificado pela molécula de ácido nucléico da invenção ou produzido pelo processo da invenção.

Preferivelmente, o antígeno está no mesmo modo pós-transitoriamente modificado e tem a mesma estrutura química como antígeno de ocorrência natural. Conseqüentemente, referido antígeno, quando produzido pelo processo da invenção, é preferivelmente produzido em células humanas.

Além do mais, a invenção refere-se a um oligonucleotídeo hibridizando em condições estridentes em uma porção da molécula de ácido nucléico da invenção compreendendo referida pelo menos uma mutação de sentido errado ou na porção complementar da mesma ou hibridizando em um ponto de ruptura da conversão de gene identificada aqui acima.

Nesta forma de realização da invenção, entende-se que os oligonucleotídeos hibridizam diretamente na seqüência que sofreu mutação ou no ponto de ruptura. O conjunto de condições de hibridização estridentes é bem descrito, por exemplo, em Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Handbook" CSH Press, Cold Spring Harbor 1989 ou Hames e Higgins, "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford (1985). Assim, a detecção das seqüências hibridizando especificamente requisitarão geralmente hibridização e condições de lavagem como 0,1xSSC, 0,1% SDS a 65°. Como é bem sabido, o comprimento da sonda e a composição do ácido nucléico a ser determinado substituem outros parâmetros das condições de hibridização estridentes. Preferivelmente, o oligonucleotídeo é um deoxinucleotídeo. Prefere-se ainda que o oligonucleotídeo compreenda 12 a 50 nucleotídeos e, mais preferivelmente, 15 a 24 nucleotídeos. A hibridização no ponto de ruptura pode ser em condições estridentes ou não-estridentes. Um exemplo de condições de hibridização não-estridentes é

hibridização e lavagem a 50°C em 4xSSC, 0,1% SDS.

Além disso, a invenção refere-se a um anticorpo ou uma ligação especificamente aptâmero ao antígeno Rhesus D da invenção.

O anticorpo pode ser testado e usado em qualquer técnica serológica bem conhecida na técnica, como técnicas de aglutinação em tubos, géis, fase sólida e técnicas de captura com ou sem anticorpos secundários, ou em citometria de fluxo com ou sem melhoria de imunofluorescência.

O anticorpo da invenção pode ser um anticorpo monoclonal ou um anticorpo derivado de ou compreendido em um anti-soro policlonal. O termo "anticorpo", como usado de acordo com a presente invenção, compreende ainda fragmentos de referido anticorpo como fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv ou scFv; ver, por exemplo, Harlow e Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor, N.Y. o anticorpo ou o fragmento do mesmo pode ser de origem natural ou pode ser produzido (semi) sinteticamente. Os produtos sintéticos compreendem também material não-proteináceo como material semi-proteináceo que tem a mesma ou essencialmente a mesma especificidade de ligação como o anticorpo da invenção. Estes produtos podem, por exemplo, ser obtidos por peptidomiméticas.

Adicionalmente, a invenção refere-se a um anticorpo ou um aptâmero ou um fago ligando-se especificamente ao antígeno Rhesus D do tipo selvagem ou a antígenos Rhesus D aberrantes, mas não ao antígeno Rhesus D da invenção. O anticorpo pode ser testado e usado em qualquer técnica serológica bem conhecida na técnica, como técnicas de aglutinação em tubos, géis e técnicas de fase sólida, técnicas de captura ou citometria de fluxo com imunofluorescência.

A este respeito, a definição, teste e origem do anticorpo ou do aptâmero, as mesmas definições acima aplicam-se aqui.

Com respeito ao termo "antígeno Rhesus D aberrante", o termo compreende mutações de sentido errado da técnica anterior, bem como conversões da técnica anterior encontradas nos genes RHD e nos antígenos correspondentes.

O termo "aptâmero" é bem conhecido na técnica e definido, por exemplo, em Osborne et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 1 (1997), 5-9 ou em Stall e Szoka, Pharm. Res. 12 (1995), 465-483.

Além do mais, a invenção refere-se a um processo para testar a
5 presença de uma molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo de fenótipo D fraco em uma amostra, compreendendo hibridizar o oligonucleotídeo da invenção ou um oligonucleotídeo hibridizando um molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo de fenótipo D fraco, referida
10 molécula de ácido nucléico transportando pelo menos uma mutação de sentido errado, como comparado ao antígeno Rhesus D do tipo selvagem, referida mutação de sentido errado causando uma substituição de aminoácidos na posição 223 ou 283 que está na posição 223, preferivelmente de Phe para Val e na posição 283, preferivelmente de Thr para Ile, referida mutação
15 de sentido errado ocorrendo ainda, preferivelmente, na posição de nucleotídeo 667 ou 848, em que, mais preferivelmente, referida mutação na posição 667 é de T para G e na posição 848 de C para T, em condições estridentes em moléculas de ácido nucléico compreendidas na amostra obtida de um humano e detectar referida hibridização.

20 Preferivelmente, o processo da invenção compreende ainda digerir o produto de referida hibridização com uma endonuclease de restrição ou submeter o produto de referida hibridização à digestão com uma endonuclease de restrição e analisar o produto de referida digestão.

A forma de realização preferida da invenção permite, por meios
25 convenientes, a diferenciação entre uma hibridização eficaz e uma hibridização não eficaz. Por exemplo, se o antígeno Rhesus D do tipo selvagem compreende uma sítio de restrição de endonuclease, o produto hibridizado será clivável por uma enzima de restrição apropriada, enquanto uma sequência que sofreu mutação não dará nenhum produto de filamento duplo
30 ou não compreenderá o sítio de restrição reconhecível e, conseqüentemente, não será clivado. Alternativamente, o oligonucleotídeo em hibridização pode somente hibridizar na sequência que sofreu mutação. Neste caso,

somente um híbrido compreendendo a seqüência que sofreu mutação, mas não a seqüência do tipo selvagem, será clivado pela enzima de restrição apropriada. A análise do produto de digestão pode ser efetuada por meios convencionais, como por eletroforese de gel que pode ser opcionalmente combinada pela coloração do ácido nucléico com, por exemplo, brometo de etídio. Combinações com outras técnicas como Southern blotting também são consideradas.

Detecção de referida hibridização pode ser efetuada, por exemplo, por um anticorpo de filamento duplo anti-DNA ou empregando um oligonucleotídeo rotulado. Convenientemente, o processo da invenção é empregado junto com técnicas de coloração como "Southern" ou "Northern blotting" e técnicas relacionadas. A rotulação pode ser efetuada, por exemplo, por protocolos padrão e inclui rotulação com marcadores radioativos, rótulos fluorescentes, fosforescentes, quimioluminescentes, enzimáticos, etc.

A invenção refere-se adicionalmente a um processo para testar a presença de uma molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo de fenótipo D fraco em uma amostra, compreendendo determinar a seqüência de ácido nucléico de pelo menos uma porção da molécula de ácido nucléico da invenção, referida porção codificando pelo menos uma de referidas mutações de sentido errado ou um ponto de ruptura de referida conversão de gene ou uma molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo de fenótipo D fraco, referida molécula de ácido nucléico transportando pelo menos uma mutação de sentido errado, como comparado ao antígeno Rhesus D do tipo selvagem, referida mutação de sentido errado causando uma substituição de aminoácidos na posição 223 ou 283 que está na posição 223, preferivelmente de Phe para Val e na posição 283, preferivelmente de Thr para Ile, referida mutação de sentido errado ocorrendo ainda, preferivelmente, em uma posição de nucleotídeo 667 ou 848 em que, mais preferivelmente, referida mutação na posição 667 é de T para G e na posição 848 de C para T.

Preferivelmente, o processo da invenção compreende ainda,

antes de determinar referida seqüência de aminoácidos, amplificação de pelo menos referida porção de referida molécula de ácido nucléico.

Preferivelmente, a amplificação é efetuada por reação de cadeia de polimerase (PCR). Outros processos de amplificação como reação de

5 cadeia de ligase também podem ser empregados.

Além do mais, a invenção refere-se a um processo para testar a presença de uma molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo de fenótipo D fraco em uma amostra, compreendendo transportar uma reação de amplificação em que pelo me-

10 nos um dos iniciadores empregados de referida reação de amplificação é o oligonucleotídeo da invenção ou um oligonucleotídeo hibridizando em uma molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para o fenótipo D fraco, referida molécula de ácido nucléico transportando pelo menos uma mutação de sentido errado, como comparado ao antígeno

15 Rhesus D do tipo selvagem, referida mutação de sentido errado causando uma substituição de aminoácidos na posição 223 ou 283, que está na posição 223, preferivelmente de Phe para Val e na posição 283, preferivelmente de Thr para Ile, referida mutações ocorrendo ainda, preferivelmente, na posição de nucleotídeo 667 ou 848, em que, mais preferivelmente, referida

20 mutação na posição 667 é de T para G e na posição 848 de C para T e testando para um produto de amplificação.

O processo da invenção resultará em uma amplificação somente da seqüência de marcação, se referida seqüência de marcação conduz a ou pelo menos uma mutação. Isto é porque o oligonucleotídeo não irá preferi-

25 velmente, em condições de hibridização estridentes, hibridizar na seqüência do tipo selvagem (com a consequência de que nenhum produto de amplificação é obtido), mas somente na seqüência que sofreu mutação. Naturalmente, oligonucleotídeos iniciadores hibridizando em um ou mais de um, de modo que duas seqüências que sofreram mutações podem ser empregadas no processo da invenção. A última forma de realização pode ser favorá-

30 vel em casos onde combinações de mutações são testadas. É importante notar que nem todas ou nenhuma de referidas mutações são necessaria-

mente mutações de sentido errado. Isto pode ser verdadeiro para casos onde outros tipos de mutações ocorrem em combinação com as mutações de sentido errado acima ou com a conversão de gene acima.

5 Preferivelmente, no processo da invenção, referida amplificação ou reação de amplificação é ou é efetuada pela reação de cadeia de polimerase (PCR). Outros processos de amplificação como reação de cadeia de ligase também podem ser empregados.

10 Além disso, a invenção refere-se a um processo para testar a presença de um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo de fenótipo D fraco em uma amostra, compreendendo testar uma amostra obtida de um humano para ligação específica ao anticorpo ou aptâmero ou fago da invenção ou a um anticorpo ou aptâmero ou fago em um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo de fenótipo D fraco e codificado por uma molécula de ácido nucléico transportando pelo menos uma mutação de sentido errado, como comparado ao antígeno Rhesus D do tipo selvagem, referida mutação de sentido errado causando uma substituição de aminoácidos na posição 223 ou 283, que está na posição 223, preferivelmente de Phe para Val e na posição 283, preferivelmente de Thr para Ile, referida mutação de sentido errado ocorrendo ainda, preferivelmente, na posição de oligonucleotídeo 667 ou 848, onde, mais preferivelmente, referida mutação na posição 667 é de T para G e na posição 848 de C para T.

Teste para ligação pode, novamente, envolver o emprego de técnicas padrão como ELISAs; ver, por exemplo, Harlow e Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor.

25 A invenção refere-se também ao processo para testar uma amostra para a presença de antígeno Rhesus D do tipo selvagem e a ausência de antígeno Rhesus D da invenção, compreendendo testar uma amostra obtida de um humano para ligação específica ao anticorpo ou aptâmero ou fago da invenção, referido anticorpo ou aptâmero ou fago ligando-se especificamente ao antígeno Rhesus D do tipo selvagem ou a antígenos Rhesus D aberrantes, mas não ao antígeno Rhesus D da invenção.

Resultados obtidos de acordo com seu processo da invenção

podem bem ser empregados em estratégias de transfusão de sangue, como descrito acima.

Preferivelmente, no processo da invenção, referida amostra é sangue, soro, plasma, tecido fetal, saliva, urina, tecido mucosal, muco, tecido vaginal, tecido fetal obtido da vagina, pele, cabelo, folículo de cabelo ou outro tecido humano.

Além do mais, o processo da invenção compreende, preferivelmente, a etapa de enriquecimento de células fetais. Este enriquecimento pode ser obtido usando anticorpos apropriados, lecitinas ou outros reagentes ligando especificamente células fetais ou por qualquer técnica experimentando a separação diferencial de células maternas e fetais, como por gradientes de densidade. Também preferivelmente, em referido processo, DNA fetal ou mRNA de tecido de material como sangue periférico, soro ou plasma podem ser extraídos vantajosamente, de acordo com procedimentos convencionais.

Em uma outra forma de realização preferida do processo da invenção, referida molécula de ácido nucléico ou material proteináceo de referida amostra é fixada a um suporte sólido.

Preferivelmente, referido suporte sólido é um chip.

As vantagens dos chips são bem conhecidas na técnica e não necessitam ser discutidas aqui em detalhe. Estas incluem o tamanho pequeno bem como um acesso fácil de análises baseadas em computador para análises.

Além do mais, a presente invenção refere-se ao uso da molécula de ácido nucléico da invenção ou de uma molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D, contribuindo para ou indicativo de fenótipo D fraco, referida molécula de ácido nucléico transportando pelo menos uma mutação de sentido errado, como comparado ao antígeno Rhesus D do tipo selvagem, referida mutação de sentido errado causando uma substituição de aminoácidos na posição 223 ou 283, que está na posição 223, preferivelmente de Phe para Val e na posição 283, preferivelmente de The para Ile, referida mutação de sentido errado ocorrendo ainda, preferivelmente, na

posição de nucleotídeo 667 ou 848, em que, mais preferivelmente, referida mutação na posição 667 é de T para G e na posição 848 de C para T ou de uma combinação das mesmas para a análise de um fenótipo D de Rhesus fraco.

5 A análise pode ser efetuada, por exemplo, na base dos processos acima descritos.

A invenção refere-se também ao uso da molécula de ácido nucleico da invenção, do vetor da invenção ou do antígeno Rhesus D da invenção para a avaliação da afinidade, avidéz e/ou reatividade de anticorpo anti-D monoclonais ou de anti-soros anti-D policlonais ou de anti-soros anti-globulina e antiglobulina-humana ou de preparações dos mesmos.

10 A invenção refere-se, também, ao uso de células, preferivelmente de células do sangue vermelho, de probandas para a avaliação da afinidade, avidéz e/ou reatividade de anticorpo anti-D monoclonais ou de anti-soros anti-D policlonais ou de anti-soros antiglobulina e antiglobulina-humana ou de preparações dos mesmos.

Referidas preparações podem ser providas de acordo com técnicas bem conhecidas na técnica. Referidas preparações podem compreender estabilizadores como albuminas, outra azida de sódio, íons de sal, tampões, etc. A formulação da preparação pode ter uma influência sobre as características de ligação dos anticorpos, como é bem conhecido na arte.

20 Por exemplo, em uma primeira etapa, o gene Rhesus D de um portador ou doador de sangue e seu estado alélico é analisado e é determinado se referido gene compreende uma mutação que foi verificada de acordo com a presente invenção. Em uma segunda etapa, referida mutação é correlacionada a uma certa densidade de antígeno RhD na superfície de células do sangue vermelho. Convenientemente, referida correlação pode ser estabelecida pelo dado provido na presente invenção (como mutações per se) e técnicas que são bem conhecidas na técnica (ver, por exemplo, Jones et al., 1996, Flegel e Wagner, 1996). Em uma terceira etapa, os aspectos de um anticorpo ou de um anti-soro como reatividade, sensibilidade, afinidade, avidéz e/ou especificidade são determinados com técnicas serológicas de grupos

sangüíneos usando, preferivelmente, células do sangue vermelho que foram, molecularmente e com respeito à densidade de superfície do antígeno RhD, caracterizadas como descrito na etapa 2. Estes dados podem ser usados, por exemplo, em controles de qualidade, padronização, etc.

- 5 A invenção será mais útil para caracterização, padronização e controle de qualidade de anti-soros monoclonais e policlonais, preferivelmente anti-soros ou monoclonais anti-D. Além disso, por exemplo, anti-soros antiglobulina e globulina anti-humano podem ser caracterizados na base dos ensinamentos da presente invenção. Um anticorpo monoclonal
- 10 anti-D apropriadamente caracterizado pode ser usado convenientemente em diagnósticos de RhD. Por exemplo, um anticorpo monoclonal apropriadamente caracterizado será utilizável na determinação da densidade do antígeno Rhesus D na superfície de células do sangue. Valores de corte para anticorpos monoclonais utilizáveis em diagnóstico podem ser assim estabelecidos. Isto é importante para o controle de qualidade de anticorpos usa-
- 15 dos em diagnósticos de RhD.

Assim, a invenção refere-se também a um processo para a caracterização de anticorpos monoclonais ou anti-soros policlonais ou de uma preparação dos mesmos, referido processo compreendendo:

- 20 (a) testar o ácido nucléico da amostra de uma probanda para a presença de uma mutação, como definido de acordo com a invenção;
- (b) correlacionar, na base do estado de mutação e do estado alélico do gene RhD, o ácido nucléico com a densidade do antígeno RhD na superfície de células do sangue vermelho de referida probanda;
- 25 (c) reagir referidos anticorpos monoclonais ou anti-soros policlonais ou referida preparação dos mesmos com uma célula transportando o antígeno RhD em sua superfície;
- (d) caracterizar referidos anticorpos monoclonais e anti-soros policlonais ou referida preparação dos mesmos na base dos resultados ob-
- 30 tidos na etapa (c).

Com respeito ao termo "estado alélico", este termo descreve as possibilidades de que os alelos de *RHD* em uma probanda estão presentes

em um estado homozigótico, heterozigótico ou hemizigótico. Também compreendida por este termo é a possibilidade de que dois alelos transportem duas mutações diferentes (incluindo a conversão) acima definida.

Em uma forma de realização preferida do processo da invenção, referida caracterização compreende a determinação da reatividade, sensibilidade, avidéz, afinidade, especificidade e/ou outras características de anticorpos e anti-soros.

Além disso, prefere-se um processo em que referida célula transportando o antígeno RhD em sua superfície é uma célula do sangue vermelho.

A invenção refere-se também a um processo para determinar se um paciente necessitando de uma transfusão de sangue deve ser transfundido com sangue Rh D negativo de um doador, compreendendo a etapa de testar uma amostra de referido paciente para a presença de um ou mais antígenos Rh D da invenção, em que um teste positivo para pelo menos um de referidos antígenos é indicativo da necessidade de transfusão com sangue Rh negativo. A invenção tem implicações importantes para planejar uma terapia de transfusão em humanos. Por exemplo, agora pode ser convenientemente testado se um paciente necessita realmente de uma transfusão com um sangue Rh D negativo ou se estas precauções não necessitam ser tomadas.

A transfusão de glóbulos vermelhos de alguns subgrupos molecularmente definidos do fenótipo D fraco determinada por tais processos pode ser imunogênica, se portadores Rhesus D do tipo selvagem, um antígeno D aberrante ou outro tipo de D fraco da invenção foram transfundidos por alguns subgrupos do fenótipo D fraco. Os portadores, como doadores de sangue, podem ser determinados por processos previamente estabelecidos na arte ou por processos estabelecidos na invenção, e, subseqüentemente, a transfusão de alguns subgrupos do fenótipo D fraco pode ser impedida.

Além do mais, a invenção refere-se a um processo para determinar se sangue de um doador pode ser usado para transfusão em um paciente

necessitando do mesmo, compreendendo a etapa de testar uma amostra de referido doador para a presença de um ou mais antígenos Rh D da invenção, em que um teste positivo para pelo menos um de referidos antígenos exclui a transfusão de pacientes que são tipados como tendo antígeno D do tipo selvagem ou (a) tipo(s) de D fraco diferentes de tipo(s) D fraco de referidos doadores.

Na base do processo da invenção, é vantajoso e desejado impedir transfusão de um paciente com sangue tipado D de um doador, se os antígenos D fraco em ambos doador e recipiente não são totalmente idênticos.

10 As amostras referidas nos processos descritos acima podem ser amostras que são referidas por todo o relatório, como sangue, soro, etc.

Com respeito às regras para transfusão em um paciente na base de qualquer um dos processos descritos acima, o máximo cuidado deve ser tomado para que programa de transfusão subótima seja evitado. O fator de risco deve sempre ser considerado pelo clínico encarregado. Em todos os casos, o risco potencial para o paciente deve ser minimizado.

A presente invenção é particularmente apropriada para estabelecer critérios que guiarão as estratégias futuras no programa de transfusão de sangue. De acordo com os critérios moleculares estabelecidos pela invenção, o fenótipo D fraco pode ser agrupado. Alguns subgrupos molecularmente definidos do fenótipo D fraco determinado por estes processos podem tender à imunização, se os portadores foram transfundidos com o antígeno Rhesus D do tipo selvagem, um antígeno D aberrante ou outro tipo D fraco da invenção, e podem produzir um anti-D. Estes portadores podem ser determinados por processos estabelecidos na invenção e, subsequente-
mente, transfundidos com componentes do sangue Rhesus negativo, como unidades do sangue de eritrócito, trombócito e plasma. A maioria dos portadores com fenótipo D fraco não é, na técnica atual, considerada com tendência a ser imunizada deste modo por transfusões de sangue Rhesus D positivo e pode, conseqüentemente, por meios estabelecidos pela invenção, ser seguramente transfundida com RhD positivo, devido a sua classificação em um tipo de D fraco distinto de acordo com a presente invenção.

A invenção refere-se também ao uso de um fago, aptâmero, anticorpo monoclonal ou um anti-soro policlonal ou uma preparação dos mesmos, como caracterizado na presente invenção para determinação do antígeno RhD.

5 Em uma forma de realização preferida de referido uso, referida determinação do antígeno RhD é efetuada em conexão com tipo de grupo sanguíneo.

Além do mais, a invenção refere-se a uma preparação compreendendo o anticorpo ou aptâmero ou fago da invenção.

10 Os tipos de D fraco definidos pela invenção correlacionam-se com certas densidades de antígeno RhD e epítipo RhD, isto é, antígenos RhD por célula expressada na superfície de células do sangue (Flegel e Wagner, 1996) (dados de poucos exemplos são providos na tabela 8). Anticorpos e preparações dos mesmos podem ser testados por qualquer técnica
15 de sorologia de grupo sanguíneo padrão com um ou mais tipos de D fraco da invenção. A reatividade, sensibilidade, avides, afinidade, especificidade e/ou outras características de anticorpos e anti-soros conhecidas na técnica podem ser determinadas por sua reação com um ou mais tipos de D fraco da invenção, nas condições predeterminadas em técnicas de serologia de
20 grupo sanguíneo padrão bem conhecidas na técnica. A preparação pode ser um diagnóstico ou preparação farmacêutica.

A composição farmacêutica da presente invenção pode ainda compreender um diluente e/ou veículo farmacêuticamente aceitável. Exemplos de veículos farmacêuticos apropriados são bem conhecidos na técnica
25 e incluem soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões, como emulsões óleo/água, vários tipos de agentes umectantes, soluções estéreis, etc. Composições compreendendo estes veículos podem ser formuladas por processos convencionais bem conhecidos. As composições farmacêuticas podem ser administradas ao indivíduo em uma dosagem apropriada. Admi-
30 nistração das composições apropriadas pode ser efetuada por meios diferentes, por exemplo, por administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal ou intrabronquial. O

regime de dosagem será determinado pelo médico atendente e fatores clínicos. Como é conhecido nas técnicas médicas, dosagens para qualquer paciente dependem de muitos fatores, incluindo o tamanho do paciente, área superficial do corpo, idade, do composto particular a ser administrado, sexo, tempo e via de administração, saúde geral, e de outras drogas sendo administradas simultaneamente. Uma dosagem típica pode ser, por exemplo, na faixa de 0,001 a 1000 μg ; no entanto, dosagens abaixo ou acima desta faixa exemplar são previstas, considerando especialmente os fatores acima mencionados. Em geral, o regime como uma administração regular da composição farmacêutica deve estar na faixa de 1 μg a 10 mg unidades por dia. Se o regime é uma infusão contínua, deve estar também na faixa de 1 μg a 10 mg unidades por quilograma do peso do corpo por minuto, respectivamente. O progresso pode ser monitorado por avaliação periódica. As composições da invenção podem ser administradas localmente ou sistemicamente. A administração será geralmente parenteralmente, por exemplo, intravenosamente. DNA também pode ser administrado diretamente ao sítio de marcação, por exemplo, por liberação biolística em um sítio de marcação interno ou externo ou por cateter em um sítio em uma artéria. Preparações para administração parenteral incluem soluções não-aquosas e aquosas estéreis, suspensões e emulsões. Exemplos de solventes não-aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais como azeite, e ésteres orgânicos injetáveis como oleato de etila. Veículos aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo solução salina e meios tamponados. Veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, óleos fixados e de Ringer lactados. Veículos intravenosos incluem reabastecedores de nutriente e de fluido, reabastecedores de eletrólito (como os baseados em dextrose de Ringer), e outros. Conservantes e outros aditivos também podem estar presentes como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelatantes e gases inertes, e outros. Além disso, a composição farmacêutica da invenção pode compreender ainda agentes como interleucinas ou interferons dependendo do uso pretendido da composição farmacêutica.

Um anticorpo e sua preparação pode ser caracterizado por sua reação ou falta de reação em superfícies com certas densidades de epítipo de RhD. Por exemplo, preparações de anticorpo podem ser caracterizadas por células do sangue vermelho aglutinantes com 1.000 antígenos RhD por
5 célula - uma densidade de antígeno RhD deliberadamente selecionada para ser reunida para fins de controle de qualidade.

A invenção refere-se também ao tratamento de mulher grávida sendo Rhesus D negativo ou sendo hemizigótica para uma mutação definida acima, em que a criança é Rhesus D positivo ou porta uma mutação diferente
10 rente acima definida em um estado hemizigótico, compreendendo administrar anti-D à referida mulher.

Mulher grávida pode ser tratada atualmente com uma profilaxia anti-D, quando uma mãe Rhesus negativo está gerando um feto RhD positivo. A invenção permite a discriminação de um requisito de profilaxia anti-D
15 dependendo do estado da mãe e/ou do feto possuindo uma proteína de RhD da invenção. Uma ou mais das proteínas RhD da invenção pode tender a imunização de seus portadores e, conseqüentemente, pode ser indicativa para a terapia da mãe. Similarmente, uma ou mais proteínas RhD da invenção, quando realizada pelo feto, pode ser conhecida ser de baixa imunoge-
20 nicidade para a mãe e, assim, pode ser indicativa da omissão da profilaxia anti-D em diferença da terapia clínica atual.

A administração pode ser efetuada por vias padrão e dosagens que podem ser definidas pelo médico atendente: Mollison, 1993. Preferivelmente, um anti-D monoclonal ou combinações/misturas de anti-D monoclo-
25 nais é/são administrado (s) em dosagens de 50 µg a ou excedendo 500 µg anti-D anticorpo/anti-soros para administração intravenosa ou intramuscular (Bowman, 1998). Para o controle de qualidade destes anticorpos/anti-soros anti-D, os resultados e processos fornecidos pela presente invenção podem ser empregados vantajosamente.

30 A presente invenção refere-se também a um processo para identificar uma cadeia V_H ou V_L de anticorpo ou uma combinação das mesmas ou um aptâmero ligando-se especificamente a um polipeptídeo D fraco

da invenção, compreendendo:

(a) contactar o polipeptídeo D fraco da invenção com uma biblioteca de fago exibindo cadeias V_H e/ou V_L ou combinações das mesmas na superfície do fago ou com aptâmeros;

5 (b) identificar fago e aptâmeros que ligam-se a referido polipeptídeo D fraco; e opcionalmente

(c) repetir as etapas (a) e (b) uma ou mais vezes.

A preparação da biblioteca de fago e a triagem/identificação do anticorpo (cadeias) desejada per se é bem conhecida na técnica e estudada, por exemplo, em Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12 (1994), 433-455 e referências ali citadas. Também, aptâmeros podem ser preparados e clonados em fago de acordo com protocolos convencionais. Apesar de cadeias V_H ou V_L únicas poderem ser identificadas pelo processo da invenção como ligando-se ao polipeptídeo D fraco da invenção, prefere-se identificar combinações V_H - V_L expressadas pelo fago porque esta situação assemelha-se à situação de ligação do anticorpo natural. Repetindo as etapas (a) e (b) uma ou mais vezes, especificidades de ligação melhores podem ser identificadas. Protocolos para a otimização de propriedades de ligação como afinidades, incluindo etapas de eluição para remover fago ligado, são bem estabelecidos na técnica. Por exemplo, uma vez uma cadeia V_H com uma capacidade de ligação conveniente tenha sido encontrada, cadeias V_L podem ser identificadas que melhoram significativamente a capacidade de ligação do anticorpo, por exemplo, substituindo a cadeia V_L , que estava associada com a cadeia V_H na primeira etapa de seleção, com uma cadeia V_L mais apropriada.

25 A invenção refere-se também a um processo para identificar um anticorpo monoclonal ligando-se especificamente a um antígeno/ polipeptídeo D fraco da invenção, compreendendo:

(a) contactar o polipeptídeo D fraco da invenção com um ou mais anticorpos monoclonais;

30 (b) identificar anticorpos monoclonais que ligam-se ao referido polipeptídeo D fraco;

(c) repetir as etapas (a) e (b) uma ou mais vezes.

A invenção refere-se também a um processo para identificar uma cadeia V_H ou V_L de anticorpo ou uma combinação das mesmas ou um aptâmero ligando-se especificamente a um antígeno/polipeptídeo D fraco da invenção, compreendendo:

- 5 (a) contactar o polipeptídeo D fraco e
 - (aa) um segundo ou mais polipeptídeo (s) D fraco e/ou
 - (ab) um polipeptídeo Rhesus D normal

em que um segundo ou mais polipeptídeo (s) D fraco e/ou o polipeptídeo Rhesus D normal estão presentes em uma massa molar que é mais alta,
 10 igual ou menor do que o polipeptídeo D fraco de (a) com uma biblioteca de fago exibindo cadeias V_H ou V_L ou combinações das mesmas na superfície do fago ou com aptâmeros;

- (b) identificar fago ou aptâmeros que ligam-se a referido polipeptídeo D fraco de (a); e opcionalmente
 - 15 (c) repetir as etapas (a) e (b) uma ou mais vezes.

Particularmente preferido na etapa (ab) é que a massa molar do segundo polipeptídeo D fraco e o polipeptídeo Rhesus D normal é mais alta do que a do polipeptídeo D fraco de (a).

No caso de que somente um ciclo de seleção é empregado para
 20 a identificação (isto é, quando a etapa (c) não se aplica), prefere-se que o número de moléculas de polipeptídeo D fraco de (a) esteja em excesso molar sobre o número de partículas de fago. As formas de realização preferidas do processo para identificar uma cadeia V_H ou V_L de anticorpo ou de uma combinação das mesmas ou de um aptâmero descrito acima aplicam-se
 25 igualmente a esta forma de realização da invenção.

A invenção refere-se também a um processo para identificar um anticorpo monoclonal ligando-se especificamente a um antígeno/polipeptídeo D fraco da invenção, compreendendo:

- (a) contactar o polipeptídeo D fraco, e
 - 30 (aa) um segundo ou mais polipeptídeo(s) D fraco e/ou
 - (ab) um polipeptídeo D normal

quando o segundo ou mais polipeptídeo (s) D fraco e/ou o polipeptídeo D

normal estão presentes em uma massa molar, que é mais alta, igual ou menor do que o polipeptídeo de fraco de (a) com um ou mais anticorpos monoclonais;

(b) identificar anticorpos monoclonais que ligam-se a referido polipeptídeo D fraco de (a); e, opcionalmente

(c) repetir as etapas (a) e (b) uma ou mais vezes.

Preferivelmente, o polipeptídeo D fraco é exposto na superfície de uma célula. Uma superfície apropriada é a superfície de um eritrócito. No entanto, outras células hospedeiras podem ser transfectadas com um vetor apropriado para expressão do polipeptídeo D fraco e expressam o mesmo em sua superfície. Anticorpos também podem ligar-se a proteínas recombinantes de ou partes de proteínas de proteínas purificadas e de D fraco.

Prefere-se ainda que o polipeptídeo ou célula hospedeira seja fixado a um suporte sólido. Exemplos apropriados para suportes sólidos são placas de microtítulo ou contas.

Em um anticorpos adicionalmente preferido, subsequente à etapa (b) ou (c), a seguinte etapa é realizada:

(d) identificar a seqüência de aminoácidos das cadeias V_H ou V_L e/ou identificar as seqüências de ácido nucléico codificando referida seqüência de aminoácidos.

A identificação das seqüências de ácido nucléico/aminoácidos pode ser efetuada de acordo com protocolos convencionais: ver, por exemplo, Sambrook et al., loc. cit.

Finalmente, a invenção de refere a um kit compreendendo:

- (a) o oligonucleotídeo da invenção; e/ou
- (b) o anticorpo da invenção;
- (c) o aptâmero da invenção; e/ou
- (d) o fago da invenção.

O kit da invenção que pode compreender vários tipos de anticorpos descritos acima, é particularmente apropriado para a análise de D fraco em amostras obtidas de humanos. Os componentes do kit podem ser embalados como apropriado. Preferivelmente, componentes diferentes são

embalados em frascos diferentes.

A descrição do teor dos documentos como citado neste relatório é incorporado aqui por referência.

As figuras mostram:

5 Figura 1. Representação esquemática das variações de amino-ácidos observadas nos tipos de D fraco com mutações de sentido errado únicas. Os aminoácidos afetados da proteína de RhD normal predominante e suas posições são mostradas no topo. Suas substituições ocorrendo nos tipos de D fraco são mostradas abaixo da barra.

10 Figura 2. O nucleotídeo de cDNA e seqüências de aminoácidos pré-ditas do alelo predominante do gene *RHD*. As seqüências de consenso são mostradas, as quais são depositadas na base de dados da seqüência de nucleotídeos EMBL sob o número de acesso X54534 por Avent et al. e modificadas como indicado na descrição (C a 1.036). As posições dos nu-
15 cleotídeos e aminoácidos são indicadas pelos números acima e abaixo das seqüências, respectivamente.

 Figura 3. Parte do íntron 5 dos genes *RHCE* e *RHD*. A seqüência de nucleotídeos do gene *RHCE* é mostrada. Números indicam a posição relativa à primeira base do exon 5 no gene *RHCE*. Traços indicam nucleotí-
20 deos no gene *RHD* que são idênticos ao gene *RHCE*. A região de ponto de ruptura 5' (178 bp) da característica de conversão de gene para categoria D do tipo III e IV é indicada por asteriscos. As seqüências de nucleotídeos de íntron 5 completas são depositadas em EMBL/GenBank sob os números de acesso Z97333 (*RHCE*) e Z97334 (*RHD*).

25 Figura 4. Detecção de tipos de D fraco por PCR-RFLP. Quatro tipos de D fraco abrigando mutações de ponto que obliteraram sítios de res-
 trição: tipo 1 de D fraco desprovido de um sítio *A/w44* (Painel A), tipo 3 de D fraco um sítio *SacI* (Painel C), tipo 4 de D fraco um sítio *A/IuI* (Painel D) e tipo D fraco um sítio *MspI* (Painel E). Em um quinto tipo de D fraco, uma
30 mutação de ponto introduziu um sítio de restrição: tipo 2 de D fraco ganhou um sítio *A/IuI* (Painel B). No lado esquerdo dos géis, escadas de 100 bp são mostradas; a posição dos fragmentos de 500 bp e 100 bp são indicadas no

lado direito dos painéis. Para a reação PCR do painel A, a aproximação de 3.000 bp do fragmento de restrição maior não é mostrada.

O exemplo ilustra a invenção.

Exemplo: Análise molecular de amostras do fenótipo D fraco

5 Um processo para seqüenciamento específica de *RHD* dos dez exons de *RHD* e seus sítios de união foi desenvolvido (tabelas 1 e 2). Em uma estratégia de análise seqüencial, amostras de sangue com expressão fraca de antígeno D foram checadas por este processo, PCR-RFLP (tabela 3) e PCR-SSP *RHD* (Gassner et al., 1997). Para este fim, amostras de san-
10 gue anticoaguladas com citrato ou EDTA foram coletadas de doadores de sangue brancos e caracterizadas como D fraco durante tipagem do doador de acordo com padrões publicados ("teste D^U") (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer and Bundesgesundheitsamt, 1992), como descrito (Wagner et al., 1995). Amostras VI de categoria D foram excluídas deste
15 estudo.

Seqüência de codificação de *RHD* em fenótipo D fraco. Seqüenciamento de dez exons de *RHD* de DNA genômico. DNA foi preparado como descrito anteriormente (Gassner et al., 1997). Seqüenciamento de nucleotídeos foi realizada com uma unidade de seqüenciamento de DNA (Prism dye
20 terminator cycle-sequencing kit with AmpliTaq FS DNA polymerase; ABI 373A, Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemanha). Seqüenciamento de nucleotídeos de extensões representativas de todos os dez exons de *RHD* e partes do promotor (ver abaixo) foi realizada usando iniciadores (tabela 1) e procedimentos de amplificação (tabela 2) que obviaram a necessidade de
25 etapas de subclonagem.

Controle da especificidade de *RHF*. Exons 3 a 7 e 9 de *RHD* transportam pelo menos um nucleotídeo específico de *RHD*, que foi usado para verificar a origem de *RHD* das seqüências. Para exon 1, nucleotídeos característicos nas partes adjacentes do íntron 1 foram usados (base de
30 dados da seqüência de nucleotídeos EMBL, números de acesso Z97362 e Z97363). Para exon 8, a especificidade de *RHD* da amplificação PCR foi checada por seqüenciamento não-específica de *RHD* do exon 9 informativo,

uma vez que exons 8 e 9 foram amplificados como um amplicon PCR (tabela 2). Exons 2 e 10 foram amplificados em um modo específico de *RHD* (tabela 2) com base nas seqüências de nucleotídeos específicas de *RHD* publicadas usadas (base de dados da seqüência de nucleotídeos EMBL, números de acesso U66340 e U66341; Kemp et al., 1966; Le Van Kim et al., 1992); nenhum amplicon PCR foi obtido em controles de RhD negativo. Todas as amostras de D fraco e de D normal mostraram um G na posição 654 (Arce et al., 1993) e um C na posição 1036 (Le Van Kim et al., 1992), suportando a noção (Cartron, 1996) que o C (Le Van Kim et al., 1992) e T alternativamente descritos (Arce et al., 1993), respectivamente, foram erros de seqüenciamento.

Deteccão de mutações específicas de D fraco por PCR-RFPL e PCR-RFLP. PCR-RFPL bem como PCR-SSP RH (Gassner et al., 1997) foram desenvolvidos ou aplicados para caracterizar substituições de nucleotídeos distintas detectadas em cinco alelos de *RHD* (ver também tabelas 3 e 4): A substituição de C para G na posição 8 leva à perda de um sítio de restrição *SacI* em amplicons obtidos com re01 e re11d (G para A em 29, perda do sítio *MspI*, re01/re11d; C para A em 446, perda do sítio *AluI*, rb20d/rb21d, T para G em 809, perda do sítio *Alw44I*, rf51/re71; G para C em 1154, introdução do sítio *AluI*, re82/re93). Condições para a reação PCR de rf51/re71 foram como mostrado na tabela 2. A reação de rb20d/rb21d foi feita com polimerase Taq não-revisada (Boehringer Mannheim ou Qiagen), com desnaturação em 2 s a 94°C, recombinação em 30 s a 60°C e extensão em 30 s a 72°C. As outras reações PCR foram feitas com polimerase Taq não-revisada com desnaturação em 20 s a 94°C, recombinação em 30 s a 55°C e extensão em 1 min a 72°C.

Outros quatro alelos de *RHD* foram detectados por um PCR-SSP¹⁵ RH padrão: os alelos (T201R, F223V) *RHD* e (S182T, K198N, T201R) *RHD* desprovidos de amplicons específicos para exon 4 de *RHD*, os alelos (G307R) *RHD* e (A276P) *RHD* dos para o exon 6 de *RHD*. Para todos os outros tipos de D fraco, a autenticidade das mutações de ponto foi checada por seqüenciamento de nucleotídeos de amplicons PCR independentes.

Seqüenciamento de exons 6 a 9 no tipo III D^{IV}. No tipo III D^{IV}, exons 6 a 9 foram amplificados e seqüenciados usando iniciadores que foram específicos para *RHCE* e *RHD*. Conseqüentemente, o iniciador re71 (tabela 2) foi substituído com iniciador rb7; iniciador re621 por rb26; e iniciador re52¹ por re74.

Dezesseis alelos de *RHD* com trocas de nucleotídeos distintas codificando substituições de aminoácidos foram identificados (tabela 4). Um alelo representou um alelo híbrido de *RHD-CE-D* típico, ainda não-publicado, apelidado aqui tipo III D^{IV}. Outro alelo foi DHMi (Liu et al., 1996). Dos 14 alelos restantes, 12 mostraram mutações de sentido errado desconhecidas únicas, mas anteriormente distintas. Nenhum dos aminoácidos variantes codificados nas posições ocorreu nas posições correspondentes nas proteínas RhCE. Dois alelos demonstraram trocas de nucleotídeos múltiplas típicas para o gene *RHCE*, que foram espalhados por seqüências específicas de *RHD*.

Distribuição de alelos de D fraco em brancos. Um conjunto de 161 amostras com expressão fraca de antígeno D foram escolhidos de doadores de sangue aleatórios do Sudoeste da Alemanha. Categoria D VI amostra mas nenhum outro D parcial foi excluído por processos sorológicos. Assim, três amostras representaram D parcial conhecido (DHMi (Liu et al, 1996) e categoria D IV (Lomas et al 1989)). Sem qualquer exceção, todas as amostras podem ser concedidas a alelos *RHD* distintos, com seqüências de codificação aberrantes (Tabela 5). Para o fim da presente invenção, é proposto que novos tipos D fraco moleculares devem ser referidos por nomes triviais, por exemplo Tipo 1 D fraco, ou por suas estruturas moleculares, por exemplo *RHD* (V27OG). O tipo 1 D fraco foi o alelo *RHD* conhecido mais freqüentemente (f= 1:277), com seqüência de codificação aberrante, excedendo mesmo a freqüência do alelo D^{VII} (Wagner et al, 1997).

Substituições de aminoácidos em alelos D fraco são agrupadas. As substituições de aminoácidos observadas em tipos D fraco com mutações de sentido errado únicas não foram uniformemente distribuídas na proteína RhD (figura 1). A maior parte das substituições ocorreu na região de posições de aminoácido 267 a 397. As substituições de aminoácidos úni-

cas e múltiplas em menores porções de proteína RhD em torno de posições 2 a 13, 149 e 179 a 225 (tipo D fraco 4 e 14) foram também encontradas em alelos D fraco. De acordo com o modelo de laço RhD corrente, os aminoácidos envolvidos foram posicionados nos segmentos de proteína intracelular e

5 transmembrana.

Controles de fenótipo RhD normal e promotor *RHD*. Seis amostras de controle com fenótipo RhD normal mostraram uma seqüência de proteína RhD normal por sequenciamento específico *RHD* de dez exons *RHD*. Para verificar mutações no promotor *RHD*, uma região de 675 bp

10 usando par de iniciador rb13 e rb11d foi amplificada (tabela 2). A região de promotor foi sequenciada usando iniciadores re02 e re01 partindo em posição de nucleotídeo - 545 com relação ao primeiro nucleotídeo de códon de partida. Uma amostra de cada tipo D fraco, DHMi e tipo D^{IV} III foi empregada. Não foi encontrado desvio de seqüência de promotor *RHD* publicado

15 (Huang, 1996).

Evidência estatística que mutações de sentido errado podem causar fenótipos D fraco. A freqüência de proteínas RhD alteradas em D fraco (158 de 158) e amostras D normais (0 de 6) foi estatisticamente significativamente diferente ($p < 0,0001$, 2x2 tabela de contingência, teste exato

20 de Fisher). Uma seqüência de codificação RhD normal no fenótipo D fraco foi esperada para ocorrer em menos que 1,9% (limite superior de 95% de intervalo de confiança, distribuição Poisson). Foi ainda excluído que estas substituições de aminoácidos refletiram mudanças de nucleotídeos aleatórias somente, devido a duas observações: (i) nos 417 códons de gene *RHD*,

25 2.766 mutações de sentido errado e 919 silentes, podem ocorrer. Se as mudanças de meridianos em alelos D fraco forem aleatórias, as mutações silentes foram esperadas com uma freqüência de 0,249. Uma mutação silente foi observada dentre um total de 18 mutações em alelos D fraco ($p = 0,039$, distribuição binomial). As mutações sem sentido foram consideradas para

30 evitar expressão RhD (Avent et al, 1997b) e assim excluídas do cálculo. (ii) 1.796 bp de gene *RHD* foram sequenciadas representando uma seqüência de codificação de 1.251 bp e seqüência de não-codificação de 545 bp. Se

as mudanças de nucleotídeos forem aleatórias, sua ocorrência na sequência de não-codificação de alelos D fraco foi esperada com uma frequência de 0,303. Todas as 18 mutações foram, no entanto, localizadas na sequência de codificação ($p = 0,005$, distribuição binomial).

5 Polimorfismos *RHD* específicos para haplotipo . Íntrons 3 e 6 foram analisados. Para verificar o íntron *RHD* 3 por RFLP, a parte 3' de íntron 3 usando par de iniciador específico *RHD* rb46 e rb12 foi amplificada e os produtos PCR digeridos com *HaeIII*. Para examinar as repetições em tandem TATT em íntron 6 *RHD*, o íntron 6 de comprimento completo usando
10 o par de iniciador específico para *RHD* rf51 e re71 e iniciador rg62 foi amplificado usado para sequenciamento.

As sequências *RHD* polimórficas que diferiram entre os alelos *RHD* prevalentes de haplotipos CDe e cDE foram detectadas (tabela 6). No íntron *RHD* 3, se tem um polimorfismo G/C que determinou um *HaeIII*-
15 RFLP em posição -371 com relação à junção íntron 3/ exon 4. Em íntron *RHD* 6, se tem um comprimento variável TATT de repetição em tandem partindo de 1.915 bp 3' de exon 6. No alelo *RHD* prevalente de haplotipo CDe, o sítio de restrição *HaeIII* estava presente e a região de repetição TATT compreendia 9 repetições. No alelo *RHD* prevalente do haplotipo
20 cDE, o sítio de restrição *HaeIII* estava ausente e a região de repetição TATT compreendia 8 repetições. Os alelos D fraco foram idênticos aos alelos prevalentes do mesmo haplotipo *RH* com relação a estes polimorfismos em íntron 3 e 6, com a única exceção de D fraco tipo 4 que mostrou 13 repetições TATT. Foi concluído que os alelos D fraco evoluíram independentemente em diferentes haplotipos *RH*.
25

Tabela 1. Iniciadores usados

Nome	Sequência de nucleotídeos	Região genômica	Posição ¹	Filamentos	RHD específico
ra21	gtgccacttgactgggact	intron 2	2,823 a 2,842	sentido	não
rb7	atctctccaagcagaccagcaagc	exon 7	1,022 a 998	anti-sentido	sim
rb11	taccttgaattaagcacttcacag	intron 4	161 a 185	sentido	sim
rb12	tcctgaacctgctctgtgaagtgc	intron 4	198 a 175	anti-sentido	sim
rb13	ciagagccaaacccacatctcctt	promoter	-675 a -652	sentido	não
rb15	ttattggctacttggtgcc	intron 5	-612 a -630	anti-sentido	não
rb20d	tcctggctctccctctct	intron 2	-25 a -8	sentido	sim
rb21	aggccctctccagcac	intron 3	28 a 11	anti-sentido	não
rb21d	cccaggctccctctccagcac	intron 3	32 a 11	anti-sentido	não
rb22	gggagatttttcagccag	intron 4	82 a 64	anti-sentido	não
rb24	agaccttggagcaggagtg	intron 4	-53 a -34	sentido	não
rb25	agcaggaggatgttacag	intron 5	-111 a -93	sentido	não
rb26	aggggtgggtagggaatag	intron 6	-62 a -43	sentido	não
rb44	gcttgaatagaagggaatggagg	intron 7	≈ 3,000	anti-sentido	não
rb46	tggcaagaacctggacctgactt	intron 3	-1,279 a -1,255	sentido	não
rb52	ccagggtgttaagcattgtgtacc	intron 7	≈ - 3,300	sentido	sim
re01	atagagaggccagcacaa	promoter	-149 a -132	sentido	sim
re02	tgtaactatgaggagtcag	promoter	-572 a -554	sentido	sim
re11d	agaagatgggggaatcttttct	intron 1	129 a 106	anti-sentido	não
re12d	attagccgggcacgggtggca	intron 1	-1,188 a -1,168	sentido	sim
re13	actctaatttcataccacc	intron 1	-72 a -53	sentido	não
re23	aaaggatgcaggaggaatgtaggc	intron 2	251 a 227	anti-sentido	não
re31	tgtatgacctctcctcagggt	exon 3	472 a 455	anti-sentido	sim
re617	ctcagctcactgcaaccic	intron 6	1,998 a 2,017	sentido	não
re621	catcccccttgggtggcc	intron 6	- 102 a -85	sentido	sim
re71	accagcaagctgaagtgtagcc	exon 7	1,008 a 985	anti-sentido	sim
re73	ccttttgcctctgatgacc	intron 7	- 67 a -48	sentido	não
re74	tatccatgaggtgctgggaac	intron 7	≈ -200	sentido	não
re75	aaggtaggggctggacag	intron 7	≈ 120	anti-sentido	sim
re82	aaaaatcctgtgtccaaac	intron 8	≈ -45	sentido	sim
re83	gagattaaaaatcctgtgtcca	intron 8	≈ -50	sentido	não
re91	caagagatcaagccaaaatcagt	intron 9	≈ -40	sentido	não
re93	caccgcgatgtcagactattggc	intron 9	≈ 300	anti-sentido	não
rf51	caaaaaccattctcccg	intron 5	-332 a -314	sentido	não
rg62	tgtattccaggcagaaggc	intron 6	1,736 a 1,755	sentido	não
rh5	gcacagagacggacacag	5' UTR ²	-19 a -2	sentido	não
rh7	acgtacaaatgcaggcaac	3' UTR ²	1,330 a 1,313	anti-sentido	não
rr1	tgttgagagaggggtgatg	5' UTR	-60 a -41	sentido	não
rr3	cagtcgtgtttaccagatg	3' UTR	1,512 a 1,492	anti-sentido	sim
rr4	agcttactggatgaccacca	3' UTR	1,541 a 1,522	anti-sentido	sim

¹ As posições dos oligonucleotídeos sintéticos são indicadas com relação a suas distâncias da primeira posição de nucleotídeo do códon ANTÍGENO RHESUS D de partida para todos os iniciadores no promotor e nos exons, incluindo a parte não-traduzida 3' do exon 10, ou com relação a seus limites exon/intron adjacentes para todos os outros iniciadores. Iniciador ra21 foi descrito anteriormente (Poulter et al., 1996).

² 5' UTR: região não-traduzida 5' do exon 1; UTR"região não-traduzida 3' do exon 10.

Tabela 2. Processo de seqüenciamento para todos os dez exons de *RHD* de DNA genômico

Iniciadores de PCR <i>RHD</i>				Condições de PCR ¹		<i>RHD</i>	
<i>RHD</i> exon	Recombinação de extensão específica anti-sentido sentido ²			Iniciadores,		Específico ²	
Exon 1	rb13	rb11d	não	10 min	60°C	re01	sim
Exon 2	re12d	re23	sim	3 min	65°C	re13	não
Exon 3	ra21	rb21	não	10 min	60°C	re31 e rb20d	sim
Exon 4	rb46	rb12	sim	10 min	60°C	rb22	não
Exon 5	rb11	rh2	sim	10 min	60°C	rb24	não
Exon 6	rf51	re71	sim	10 min	60°C	rb25	não
Exon 7	re617	rb44	não	10 min	60°C	re621 e re75	sim
Exon 8	rb52	rb93	sim	10 min	60°C	re73	não
Exon 9	rb52	rb93	sim	10 min	60°C	re82/re83	sim/não
Exon 10	re91	rr4	sim	10 min	60°C	rr3/ rh7	sim/não

¹ Iniciadores foram usados em uma concentração de 1 mM no Expand High

5 Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha). No PCR do exon 10, a concentração de MgCl₂ foi 2,0 mM. Desnaturação foi 20 s a 92°C, recombinação 30 s, temperatura de alongamento 68°C, Tempo de alinhamento foi aumentado em 20 s para cada ciclo após o 10^o ciclo, exceto para o par de iniciadores re12d/re23.

10 ² Para obter especificidade de *RHD* para seqüenciamento de nucleotídeos genômica, os pares de iniciadores de PCR ou o iniciador de seqüenciamento ou ambos não devem detectar seqüências de nucleotídeos derivadas de *RHCE* simultaneamente. Seqüências de iniciador são dadas na tabela 1.

Tabela 3. Análise PCR-RFLO de cinco alelos de *RHD*

Alelo	Substituição	Iniciadores	PCR	Enzima de restrição
<i>RHD</i> (S3C)	8 C→G	re01	re11d	SacI
<i>RHD</i> (R10Q)	29 G→A	re01	re11d	MspI
<i>RHD</i> (A149D)	446 C→A	rb20d	rb21	AluI
<i>RHD</i> (V270G)	809 T→G	rf51	re71	Alw44I
<i>RHD</i> (G385A)	1154 G→C	re82	re93	AluI

- ¹ Condições para a reação PCR de rf51/re71, como mostrado na tabela 2. Todas as outras reações PCR foram feitas com polimerase Taq não-revisada (Boehringer Mannheim) com desnaturação em 20 s a 94°C, recombinação em 30 s a 55°C e extensão em 1 min a 72°C. Exemplos destes PCR-RFLPs de tipos 1, 2, 3, 5, 6 de D fraco são mostrados na figura 4.

Tabela 4: Bases moleculares de fenótipo D fraco

Membrana de	Efeitos na troca de		Sequência de		Localização prevista	
	nucleotídeos	proteína exons	envolvida na célula			
alelo ¹						
RHD(S3C)	C→G a 8	Ser a Cys 3	1	IC		
RHD(R10Q)	G→A a 29	Arg a Gln 10	1	IC		
RHD(W16C, T201R, F223V)	G→C a 48,	Trp a Cys 16	1	TM		
	C→G a 602,	Thr a Arg 201	4	IC		
	T→G a 667,	Phe a Val 223	5	TM		
	G→A a 819	nenhuma mudança	6	-		
	C→T a 340	Arg a Trp 114	3	TM		
RHD(R14W)	C→A a 446	Ala a Asp 149	3	TM		
RHD(A149D)	T→A a 544,	Ser a Thr 182	4	TM		
RHD(S182T, K198N, T201R)	A→T a 594,	Lys a Asn 198	4	IC		
	C→G a 602	Thr a Arg 201	4	IC		
	C→G a 602,	Thr a Arg 201	4	IC		
	T→G a 667,	Phe a Val 223	5	TM		
	G→A a 819	nenhuma mudança	6	-		
RHD(N220R)	T→C a 858	Trp a Cys 220	5	TM		
	T→G a 809	Val a Gly 270	6	TM		
	G→C a 826	Ala a Pro 276	6	TM		
	G→A a 830	Gly a Glu 277	6	TM		
	G→A a 845	Gly a Asp 282	6	TM		
RHD(G282D)	G→C a 880	Ala a Pro 294	6	TM		
RHD(A294P)	G→T a 885	Met a Ile 295	6	TM		
RHD(M295I)	G→A a 919	Gly a Arg 307	6	IC		
RHD(G307R)	G→A a 1016	Gly a Glu 339	7	TM		
RHD(G339E)	G→C a 1154	Gly a Ala 385	9	TM		
RHD(G385A)	T→C 1177	Trp a Arg 393	9	IC		
RHD(W393R)						
DHMI	C→T a 848	Thr a Ile a 283	6	EF		
D ^V tipo III	RHD-CE(6-9)-D	múltiplo	6 9	EFTM/IC		
IC - intracelular; TM - transmembranoso; EF - exofacial						

Tabela 5. Nomenclatura proposta para alelos de RHD codificando fenótipos D fraco e suas frequências de população mínimas

Nome comum	Bases moleculares (alelo)	n ¹	Frequência fenótipo ²	Frequência de população mínima ³	
				fenótipo	haplótipo
fraco D tipo 1	RHD(V270G)	95	70,29%	0,2964%	0,003606 (1:277)
fraco D tipo 2	RHD(G385A)	43	18,01%	0,0759%	0,000924 (1:1,082)
fraco D tipo 3	RHD(S3C)	7	5,19%	0,0219%	0,000266 (1:3,759)
fraco D tipo 4	RHD(T201R,F223V)	6	1,30%	0,0055%	0,000067 (1:14,925)
fraco D tipo 5	RHD(G307R)	1	0,74%	0,0031%	0,000038 (1:26,316)
fraco D tipo 6	RHD(R10Q)	1	0,74%	0,0031%	0,000038 (1:26,316)
fraco D tipo 7	RHD(G339E)	1	0,74%	0,0031%	0,000038 (1:26,316)
fraco D tipo 8	RHD(A294P)	1	0,42%	0,0017%	0,000021 (1:47,619)
fraco D tipo 9	RHD(A149D)	1	0,42%	0,0017%	0,000021 (1:47,619)
fraco D tipo 10	RHD(W339R)	1	0,42%	0,0018%	0,000021 (1:47,619)
fraco D tipo 11	RHD(M295I)	1	0,22%	0,0009%	0,000011 (1:90,909)
fraco D tipo 12	RHD(G277E)	0	.	.	.
fraco D tipo 13	RHD(A276P)	0	.	.	.
fraco D tipo 14	RHD(S182T,K198N,T201R)	0	.	.	.
fraco D tipo 15	RHD(G282D)	0	.	.	.
fraco D tipo 16	RHD(W220R)	0	.	.	.
fraco D tipo 17	RHD(R114W)	0	.	.	.
DHMc	RHD(T283I)	2	0,84%	0,0035%	0,000043 (1:23,256)
D ^v tipo III	RHD-CE(6-9)-D	1	0,60%	0,0025%	0,000031 (1:32,258)
Total		161	100%	0,4185%	0,005094

- tipo 4 de D fraco pode ser subdividido em duas formas:
- tipo 4a de D fraco; ver tipo 4 de D fraco, na tabela
- tipo 4b de D fraco *RHD* (W16C, T201R, F223V)

5 ¹ Número de amostras observadas entre 161 amostras de sangue com expressão de antígeno D fraco, Tipos 12 a 17 não foram detectadas entre estas amostras de sangue, mas encontradas independentemente.

² As frequências de fenótipo dentre amostras de D fraco foram calculadas ajustando as frequências dos fenótipos D fraco serológicos (Wagner et al., 1995) Amostras de D fraco ccDEE foram assumidas ser cDE/cdE.

10 ³ Frequências de fenótipo na população foram calculadas da frequência de população do fenótipo D fraco no sudoeste de Alemanha (Wagner et al., 1995). Estas são estimativas mínimas, porque algumas amostras com expressão de D somente moderadamente podem ter sido agrupadas em D potente normal. Frequências de haplótipos foram calculadas usando uma
15 frequência de haplótipo de 0,411 para haplótipos de RhD negativo (Wagner et al., 1995) assumindo que todas as amostras de D fraco foram heterozigóticas.

Tabela 6. Polimorfismos de *RHD* em genes *RHD* de vários haplótipos

Haplótipo ¹	Alelo	Sítio HaeIII no íntron 3	Repetição TATT No íntron 6
CDe	RHD predominante	presente	9
CDe	fraco D tipo 1	presente	9
CDe	fraco D tipo 3	presente	9
CDe	fraco D tipo 5	presente	9
CDe	fraco D tipo 7	presente	9
CDe	fraco D tipo 12	presente	9
CDe	fraco D tipo 13	presente	9
CDe	fraco D tipo 17	N.D.	9
CDe	D ^{IV} tipo III	Presente	- ²
cDE	RHD ³ predominante	ausente	8
cDE	fraco D tipo 2	ausente	8

Tabela 6. (Continuação)

Haplótipo ¹	Alelo	Sítio HaeIII no íntron 3	Repetição TATT No íntron 6
CDE	fraco D tipo 8	ausente	8
CDE	fraco D tipo 9	ausente	8
CDE	fraco D tipo 10	ausente	8
CDE	fraco D tipo 14	ausente	8
CDE	fraco D tipo 15	ausente	8
CDE	fraco D tipo 16	ausente	8
CDE	DHMi	ausente	8
C(W16C)De	RHD ⁴ predominante	presente	9
C(W16C)	fraco D tipo 4	presente	13
CDe	RHD ⁴ predominante	geralmente presente	8 ou 9
CDe	fraco D tipo 11	presente	8

¹ A associação de haplótipo do sítio HaeIII foi testada em amostras de 10 CCDee, 8 ccDEE, 10 cc (W16C) De e 10ccDee. A associação de haplótipo da repetição TATT foi testada em amostras 3 CCDee, 3 ccDEE, 1ccDEe, 2cc (W16C)De e 2 ccDee.

² Íntron 6 derivado de *RHCE* devido a uma conversão de gene.

³ Seis de sete alelos investigados mostraram 8 repetições, um 9 repetições.

⁴ O sítio HaeIII estava presente em 8 de 10 amostras testadas com sítio HaeIII mostrou 9 repetições TATT, amostras sem sítio HaeIII, 8 repetições.

10 ND= não determinado

Tabela 7. Localização prevista de segmentos da proteína de RhD relativa às membranas de células do sangue vermelho

Faixa de aminoácidos	Intracelular	Transmembranoso	Exofacial	Comprimento (aminoácidos)
1- 11	X			10 ²
12- 31		X		20
32- 53			X	22
54- 71		X		18

Tabela 7. (Continuação)

Faixa de aminoácidos	Intracelular	Transmembranoso	Exofacial	Comprimento (aminoácidos)
72- 75	X			4
76- 93		X		18
94- 110			X	17
111- 130		X		20
131- 134	X			4
135- 153		X		19
154- 169			X	16
170- 187		X		18
188- 207	X			20
208- 225		X		18
226- 238			X	13
239-256		X		18
257- 264	X			8
265- 282		X		18
283- 286			X	4
287- 306		X		20
307-333	X			27
334- 351		X		18
352- 370			X	19
371- 388		X		18
389- 417	X			29
Total	5 laços e 2 segmentos	12 hélices	6 laços	416 ²

¹ Localização da extremidade da proteína terminal carbóxi e amino de acordo com Avent et al. {*J. Biol. Chem.* 1992} e Hermand et al. {*Blood* 1993}. As hélices transmembranosas foram previstas por PHDhtm {www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html}, a hélice nas posições 371 a 388 por TMPred {ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_form.html}.

² O aminoácido (metionina) na posição 1 não é expressada na proteína RhD madura como mostrado pela seqüenciamento de aminoácidos {Avent et al., *Biochem J.*, 1988}.

Tabela 8. Densidades do epítipo de RhD na amostra para tipos de D fraco

D fraco	Densidade do epítipo de RhD (antígenos RhD/glóbulos vermelhos)
tipo 3	1.500
tipo 1	900
tipo 2	500
Tipo 12	<100

- 5 Uma amostra de cada tipo de D fraco foi testada com um anti-D policlonal (Lorne Laboratories Ltd., Redding, Berkshire, Inglaterra), como descrito anteriormente (Flegel e Wager, 1996). Resultados similares foram obtidos por anti-D monoclonal (BS228, Biotest AG, Dreieich, Alemanha'e P3x290, Diagast, Lille, França).

Referências

- Agre, P.C., Davies, D.M., Issitt, P.D., Lamy, B.M., Schmidt, P.J., Treacy, M., and Vengelen-Tyler, V. 1992. A proposal to standardize terminology for weak D antigen [Letter]. *Transfusion* 32:86-87.
- Arce, M.A., Thompson, E.S., Wagner, S., Coyne, K.E., Ferdman, B.A., and Lublin, D.M. 1993. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. *Blood* 82:651-655.
- Aubin, J.T., Le Van Kim, C., Mouro, I., Colin, Y., Bignozzi, C., Brossard, Y., and Cartron, J.P. 1997. Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *British Journal of Haematology* 98:356-364.
- Avent, N.D., Butcher, S.K., Liu, W., Mawby, W.J., Mallinson, G., Parsons, S.F., Anstee, D.J., Tanner, M.J. 1992. Localization of the C termini of the Rh(rhesus) polypeptides to the cytoplasmic face of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 267:15134-15139.
- Avent, N.D., Jones, J.W., Liu, W., Scott, M.L., Voak, D., Flegel, W.A., Wagner, F.F., and Green, C. 1997a. Molecular basis of the D variant phenotypes DNU and DII allows localization of critical amino acids required for expression of Rh D epitopes epD3, 4 and 9 to the sixth external domain of the Rh D protein. *British Journal of Haematology* 97:366-371.
- Avent, N.D., Martin, P.G., Armstrong-Fisher, S.S., Liu, W., Finning, K.M., Maddocks, D., and Urbaniak, S.J. 1997b. Evidence of genetic diversity underlying Rh D negative, weak D (D^u) and partial D phenotypes as determined by multiplex PCR analysis of the RHD gene. *Blood* 89:2568-2577.
- Avent, N.D., Rigwell, K., Mawby, W.J., Tanner, M.J., Anstee, D.J., Kumpel, B. 1988. Protein-sequence studies on Rh-related polypeptides suggest the presence of at least two groups of proteins which associate in the human red-cell membrane. *Biochem. J.* 256:1043-1046.
- Beckers, E.A., Faas, B.H., Ligthart, P., Overbeeke, M.A., von dem Borne, A.E., van der Schoot, C.E., and van Rhenen, D.J. 1997. Lower antigen site density and weak D immunogenicity cannot be explained by structural genomic abnormalities or regulatory defects of the RHD gene. *Transfusion* 37:616-623.
- Beckers, E.A.M., Faas, B.H.W., Overbeeke, M.A.M., von dem Borne, A.E.G.K., van Rhenen, D.J., and van der Schoot, C.E. 1995. Molecular aspects of the weak-D phenotype. *Transfusion* 35:50S
- Bowman, J.M. 1998. RhD hemolytic disease of the newborn. *N. Engl. J. Med.* 339:1775-1777

- Cartron, J.-P. 1996. Rh DNA - coordinator's report. *Transfusion Clinique et Biologique* 3:491-495.
- Ceppellini, R., Dunn, L.C., and Turry, M. 1955. An interaction between alleles at the Rh locus in man which weakens the reactivity of the Rho factor (D^u). *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 41:283-288.
- Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Gane, P., Mattei, M.G., Bailly, P., Gibbs, B., Colin, Y., and Cartron, J.-P. 1996. Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. *Nature Genetics* 12:168-173.
- Flegel, W. A., Müller, T.H., Schunter, F., Gassner, C., Schönitzer, D., and Wagner, F.F. 1997. D category VI type III: A D-Ce(3-6)-D hybrid protein with normal RhD antigen density on red cells [Abstract]. *Transfusion* 37S:101S
- Flegel, W.A. and Wagner, F.F. 1996. RHD epitope density profiles of RHD variant red cells analyzed by flow cytometry. *Transfusion Clinique et Biologique* 3:429-431.
- Fukumori, Y., Hori, Y., Ohnoki, S., Nagao, N., Shibata, H., Okubo, Y., and Yamaguchi, H. 1997. Further analysis of Del (D-elute) using polymerase chain reaction (PCR) with RHD gene-specific primers. *Transfusion Medicine* 7:227-231.
- Gassner, C., Schmarda, A., Kilga-Nogler, S., Jenny-Feldkircher, B., Rainer, E., Müller, T.H., Wagner, F.F., Flegel, W.A., and Schönitzer, D. 1997. RhesusD/CE typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Transfusion* 37:1020-1026.
- Hasekura, H., Ota, M., Ito, S., Hasegawa, Y., Ichinose, A., Fukushima, H., and Ogata, H. 1990. Flow cytometric studies of the D antigen of various Rh phenotypes with particular reference to D^u and D^{el}. *Transfusion* 30:236-238.
- Hermand, P., Mouro, I., Huet, M., Bloy, C., Suyama, K., Goldstein, J., Cartron, J.P., Bailly, P. 1993. Immunochemical characterization of rhesus proteins with antibodies raised against synthetic peptides. *Blood* 82:669-676.
- Huang, C.H. 1996. Alteration of RH gene structure and expression in human dCCee and DCW- red blood cells: phenotypic homozygosity versus genotypic heterozygosity. *Blood* 88:2326-2333.
- Huang, C.H. 1997. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. *Current Opinion in Hematology* 4:94-103.
- Huang, C.H., Chen, Y., and Reid, M. 1997. Human D(IIIa) erythrocytes: RhD protein is associated with multiple dispersed amino acid variations. *Am. J Hematol.* 55:139-145.

- Issitt, P.D. and Telen, M.J. 1996. D, weak D (D^w), and partial D: the molecular story unfolds. *Transfusion* 36:97-100.
- Jones, J.W., Finning, K.M., Mattock, R., Voak, D., Scott, M.L., and Avent, N.D. 1997. The serological profile and molecular basis of a new partial D phenotype, DHR. *Vox Sanguinis* 73:252-256.
- Jones, J.W., Lloyd-Evans, P., and Kumpel, B.M. 1996. Quantitation of Rh D antigen sites on weak D and D variant red cells by flow cytometry. *Vox Sanguinis* 71:176-183.
- Kajii, E., Umenishi, F., Omi, T., and Ikemoto, S. 1995. Intricate combinatorial patterns of exon splicing generate multiple Rh- related isoforms in human erythroid cells. *Human Genetics* 95:657-665.
- Kemp, T.J., Poulter, M., and Carritt, B. 1996. A recombination hot spot in the Rh genes revealed by analysis of unrelated donors with the rare D-- phenotype. *American Journal of Human Genetics* 59:1066-1073.
- Le Van Kim, C., Mouro, I., Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Cherrier, C., Cartron, J.P., and Colin, Y. 1992. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 89:10925-10929.
- Leader, K.A., Kumpel, B.M., Poole G.D., Kirkwood, J.T., Merry A.H. and Bradley, B.A. 1990. Human monoclonal anti-D with reactivity against category DVI cells used in blood grouping and determination of the incidence of the category DVI phenotype in the DU population. *Vox Sang* 58:(2):106-11
- Legler, T.J., Blaschke, V., Bustami, N., Malekan, M., Schwartz, D.W.M., Mayr, W.R., Panzer, S., and Köhler, M. 1997. RHD genotyping on exons 2, 5, 7, intron 4 and the 3' non-coding region in D^{weak}, D^V, DFR and D-- individuals. *Transfusion* 37:100S
- Liu, W., Jones, J.W., Scott, M.L., Voak, D., and Avent, N.D. 1996. Molecular analysis of two D-variants, D^{Hmi} and D^{HMi} [Abstract]. *Transfusion Medicine* 6(suppl 2):21
- Lomas, C., Grässmann, W., Ford, D., Watt, J., Gooch, A., Jones, J., Beolet, M., Stern, D., Wallace, M., and Tippett, P. 1994. FPTT is a low-incidence Rh antigen associated with a "new" partial Rh D phenotype, DFR. *Transfusion* 34:612-616.
- Lomas, C., McColl, K., and Tippett, P. 1993. Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category Dⁿ cells with monoclonal anti-D. *Transfusion Medicine* 3:67-69.
- Lomas, C., Tippett, P., Thompson, K.M., Melamed, M.D., and Hughes-Jones, N.C. 1989. Demonstration of seven epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sanguinis* 57:261-264.

- Mollison, P. L., Engelfriet, C.P., and Contreras, M. 1993. *Blood transfusion in clinical medicine*. 9th ed. London: Blackwell Scientific Publications.
- Moore, B.P.L. 1984. Does knowledge of D^u status serve a useful purpose? *Vox Sanguinis* 46S1:95-97.
- Mourant, A. E., Kopec, A.C., and Domaniewska-Sobczak, K. 1976. *The distribution of the human blood groups and other polymorphisms*. 2nd ed. London: Oxford University Press.
- Nelson, M., Barrow, L.A., Popp, H., and Gibson, J. 1995. Some observations on D antigen expression of D-positive and 'weak D- positive' red cells as assessed by flow cytometry. *Vox Sanguinis* 69:152-154.
- Nicholson, G., Lawrence, A., Ala, F.A., and Bird, G.W.G. 1991. Semi-quantitative assay of D antigen site density by flow cytometric analysis. *Transfusion Medicine* 1:87-90.
- Poulter, M., Kemp, T.J., and Carritt, B. 1996. DNA-based Rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHD status using the polymerase chain reaction. *Vox Sanguinis* 7:164-168.
- Roubinet, F., Apoil, P.A., and Blancher, A. 1996. Frequency of partial D phenotypes in the south western region of France. *Transfusion Clinique et Biologique* 3:247-255.
- Rouillac, C., Gane, P., Cartron, J.-P., Le Pennec, P.Y., and Colin, Y. 1996. Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D (D^u) and RhC/e in R^N phenotypes. *Blood* 87:4853-4861.
- Rouillac, C., Le Van Kim, C., Beolet, M., Cartron, J.P., and Colin, Y. 1995. Leu110Pro substitution in the RhD polypeptide is responsible for the D^u category blood group phenotype. *American Journal of Hematology* 49:87-88.
- Salmon, C., Cartron, J.-P., and Rouger, P. 1984. *The human blood groups*. New York: Masson.
- Scott, M. 1996. Rh serology - coordinator's report. *Transfusion Clinique et Biologique* 3:333-337.
- Siegel, D.L., Silberstein, L.E. 1994. Expression and characterization of recombinant anti-Rh(D) antibodies on filamentous phage: a model system for isolating human red blood cell antibodies by repertoire cloning. *Blood* Apr. 15:83(8):2334-44
- Stratton, F. 1946. A new Rh allelomorph. *Nature* 158:25

- Tazzari, P.L., Bontadini, A., Belletti, D., Malferrari, F., and Conte, R. 1994. Flow cytometry: a tool in immunohematology for D+^w (D^w) antigen evaluation? *Vox Sanguinis* 67:382-386.
- Tippett, P. and Sanger, R. 1962. Observations on subdivisions of Rh antigen D. *Vox Sanguinis* 7:9-13.
- Tippett, P. and Sanger, R. 1977. Further observations on subdivisions of the Rh antigen D. *Das Ärztliche Laboratorium* 23:476-480.
- Wagner, F.F. 1994. Influence of Rh phenotype on the antigen density of C, c, and D: flow cytometric study using a frozen standard red cell. *Transfusion* 34:671-676.
- Wagner, F.F., Hillesheim, B., and Flegel, W.A. 1997. D-Kategorie VII beruht einheitlich auf der Aminosäuresubstitution Leu(110)Pro. *Beiträge zur Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 34:220-223.
- Wagner, F.F., Kasulke, D., Kerowgan, M., and Flegel, W.A. 1995. Frequencies of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency antigens in South-Western Germany. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 22:285-290.
- Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer and Bundesgesundheitsamt. 1992. *Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.

REIVINDICAÇÕES

1. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência promotora heteróloga operavelmente ligada a uma molécula de ácido nucléico de SEQ ID NO:41 compreendendo pelo menos uma mutação
5 selecionada a partir do grupo consistindo em uma mutação na posição 8 de C para G, na posição 29 de G para A, na posição 48 de G para C, na posição 340 de C para T, na posição 446 de C para A, na posição 544 de T para A, na posição 594 de A para T, na posição 602 de C para G, na posição 658 de T para C, na posição 667 de T para G, na posição 809 de T para G, na
10 posição 819 de G para A, na posição 826 de G para C, na posição 830 de G para A, na posição 845 de G para A, na posição 880 e G para C, na posição 885 de G para T, na posição 919 de G para A, na posição 1016 de G para A, na posição 1154 de G para C, e na posição 1177 de T para C.

2. Vetor de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato
15 de que as mutações são (i) $T \rightarrow A$ na posição 544, $A \rightarrow T$ na posição 594 e $C \rightarrow G$ na posição 602; (ii) $C \rightarrow G$ na posição 602, $T \rightarrow G$ na posição 667 e $G \rightarrow A$ na posição 819; ou (iii) $G \rightarrow C$ na posição 48, $C \rightarrow G$ na posição 602, $T \rightarrow G$ na posição 667 e $G \rightarrow A$ na posição 819.

3. Bactéria ou levedura, caracterizada pelo fato de que é transformada com o vetor como definido na reivindicação 1 ou 2.
20

4. Processo para produzir um antígeno Rhesus D contribuindo para o fenótipo D fraco, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a bactéria ou levedura, como definida na reivindicação 3, sob condições apropriadas e isolar o antígeno Rhesus D produzido.

25 5. Processo para testar a presença de uma molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para o fenótipo D fraco em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende hibridizar um oligonucleotídeo consistindo em um segmento de 12 a 50 nucleotídeos consecutivos da molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação
30 1 ou 2 em que o referido segmento compreende pelo menos uma das posições 8, 29, 48, 340, 446, 544, 594, 602, 658, 667, 809, 819, 826, 830, 845, 880, 885, 919, 1016, 1154 e 1177 sob condições estridentes de hibridiza-

ção e lavagem de 0.1×SSC, 0.1% SDS a 65°C com moléculas de ácido nucléico compreendidas na amostra obtida de um ser humano e detectar a referida hibridização.

5 6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que compreende ainda digerir o produto da referida hibridização com uma endonuclease de restrição e analisar o produto de referida digestão.

7. Processo para testar a presença de um ácido nucléico de codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo do fenótipo D fraco em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende sequenciar pelo menos uma porção da molécula de ácido nucleico presente na amostra e verificar a presença de uma ou mais das mutações como definidas na reivindicação 1.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que as mutações são (i) T → A na posição 544, A → T na posição 594 e C → G na posição 602; (ii) C → G na posição 602, T → G na posição 667 e G → A na posição 819; ou (iii) G → C na posição 48, C → G na posição 602, T → G na posição 667 e G → A na posição 819.

9. Processo de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que compreende ainda, antes de determinar referida sequência de ácido nucléico, a amplificação da pelo menos uma porção da referida molécula de ácido nucléico por uma reação em cadeia de polimerase (PCR).

10. Processo para testar a presença de uma molécula de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para ou indicativo do fenótipo D fraco em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende realizar uma reação em cadeia de polimerase (PCR), em que um dos iniciadores empregado na referida reação consiste em um segmento de 12 a 50 nucleotídeos consecutivos da molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 1 ou 2 em que o referido segmento compreende pelo menos uma das posições 8, 29, 48, 340, 446, 544, 594, 602, 658, 667, 809, 819, 826, 830, 845, 880, 885, 919, 1016, 1154 e 1177.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 10, caracterizado pelo fato de que a referida amostra é sangue, soro,

plasma, tecido fetal, saliva, urina, tecido mucosal, muco, tecido vaginal, tecido fetal obtido de vagina, pele, cabelo, folículo do cabelo ou outro tecido humano.

5 12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que compreende o enriquecimento de células fetais ou extração de DNA fetal ou mRNA de tecido maternal, como sangue periférico, soro, ou plasma.

10 13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 12, caracterizado pelo fato de que a referida molécula de ácido nucléico da referida amostra é fixada em um suporte sólido.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o referido suporte sólido é um chip.

15 15. Uso da molécula de ácido nucléico como definida na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que é para a análise de um fenótipo Rhesus D fraco.

20 16. Uso da molécula de ácido nucléico ou do vetor como definidos na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que é para a avaliação da afinidade, avidéz e/ou reatividade de anticorpos monoclonais ou de antisoro policlonal preferivelmente antisoro anti-D, antiglobulina ou anti-soro de antiglobulina-humana.

17. Processo para a caracterização de anticorpos monoclonais ou anti-soro policlonal ou de uma preparação dos mesmos, caracterizado pelo fato de que compreende:

25 (a) testar o ácido nucléico de amostra de um individuo testado pela presença de uma mutação, como definida na reivindicação 1 ou 2;

(b) correlacionar, com base no estado de mutação e o estado alélico de gene *RHD*, o ácido nucléico com a densidade de antígeno RhD na superfície de glóbulos vermelhos do referido individuo testado;

30 (c) reagir referidos anticorpos monoclonais ou anti-soro policlonal ou referida preparação dos mesmos com uma célula transportando o antígeno RhD em sua superfície;

(d) caracterizar referidos anticorpos monoclonais ou anti-soro

policlonal ou referida preparação dos mesmos com base nos resultados obtidos na etapa (c).

18. Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a referida caracterização compreende a determinação de reatividade, sensibilidade, avidéz, afinidade, especificidade e/ou outras características de anticorpos e anti-soro.

19. Processo de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que a referida célula transportando o antígeno RhD em sua superfície é um glóbulo vermelho.

20. Processo para identificar uma cadeia V_H ou V_L de, ou uma combinação das mesmas, ou um aptâmero especificamente ligando a um polipeptídeo D fraco, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) contatar um polipeptídeo D fraco compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:42 com pelo menos uma mutação na posição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo nas posições 3, 10, 16, 114, 149, 182, 198, 201, 220, 223, 270, 276, 277, 282, 294, 295, 307, 339, 385 e 393 com uma biblioteca de fagos expondo cadeias V_H ou V_L ou combinações das mesmas, na superfície do fago ou com aptâmeros;

(b) identificar o fato ou aptâmeros que se ligam ao referido polipeptídeo D fraco; e opcionalmente

(c) repetir as etapas (a) e (b) uma ou mais vezes.

21. Processo para identificar um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a um antígeno/polipeptídeo D fraco, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) contar um polipeptídeo D fraco compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:42 com pelo menos uma mutação na posição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo nas posições 3, 10, 16, 114, 149, 182, 198, 201, 220, 223, 270, 276, 277, 282, 294, 295, 307, 339, 385 e 393, com um ou mais anticorpos monoclonais;

(b) identificar os anticorpos monoclonais que ligam ao referido polipeptídeo D fraco; e opcionalmente

(c) repetir as etapas (a) e (b) uma ou mais vezes.

22. Processo para identificar cadeias V_H ou V_L de um anticorpo, ou uma combinação das mesmas, ou um aptâmero que se liga especificamente a um antígeno/polipeptídeo D fraco, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) contatar um primeiro polipeptídeo D fraco compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:42 com pelo menos uma mutação na posição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo nas posições 3, 10, 16, 114, 149, 182, 198, 201, 220, 223, 270, 276, 277, 282, 294, 295, 307, 339, 385 e 393; e um segundo polipeptídeo D, que é

10 (i) um polipeptídeo D fraco diferente fraco compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:42 com pelo menos uma mutação na posição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo nas posições 3, 10, 16, 114, 149, 182, 198, 201, 220, 223, 270, 276, 277, 282, 294, 295, 307, 339, 385 e 393; e/ou

15 (ii) um polipeptídeo D de SEQ ID NO:42,
em que o segundo polipeptídeo D está presente em uma massa molar que é maior, igual ou menor que o primeiro polipeptídeo D fraco,
com uma biblioteca de fagos expondo cadeias V_H ou V_L ou combinações das mesmas na superfície do fago ou com aptâmeros;

20 (b) identificar um fago ou aptâmeros que se ligam ao referido primeiro polipeptídeo D fraco; e opcionalmente

(c) repetir etapas (a) e (b) uma ou mais vezes.

25 23. Processo para identificar um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a um antígeno/polipeptídeo D fraco, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) contatar um primeiro polipeptídeo D fraco compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:42 com pelo menos uma mutação na posição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo nas posições 3, 10, 16, 114, 149, 182, 198, 201, 220, 223, 270, 276, 277, 282, 294, 295, 307, 339, 385 e 393; e um segundo polipeptídeo D, que é

30 (i) um polipeptídeo D fraco diferente compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:42 com pelo menos uma mutação na po-

sição de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo nas posições 3, 10, 16, 114, 149, 182, 198, 201, 220, 223, 270, 276, 277, 282, 294, 295, 307, 339, 385 e 393; e/ou

(ii) um polipeptídeo D de SEQ ID NO:42

5 em que o segundo polipeptídeo D está presente em uma massa molar que é maior, igual ou menor que o primeiro polipeptídeo D fraco com um ou mais anticorpos monoclonais,

(b) identificar os anticorpos monoclonais que ligam ao referido primeiro polipeptídeo D fraco e opcionalmente

10 (c) repetir as etapas (a) e (b) uma ou mais vezes.

24. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 23, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo D fraco é exposto sobre a superfície de uma célula.

25. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 20 a 24, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo ou bactérias e leveduras são fixados a um suporte sólido.

26. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 25, caracterizado pelo fato de que subsequente à etapa (b) ou (c), a seguinte etapa é realizada:

20 (d) identificar a sequência de aminoácidos das cadeias V_H ou V_L e/ou identificar a sequência de ácido nucléico codificando a referida sequência de aminoácido.

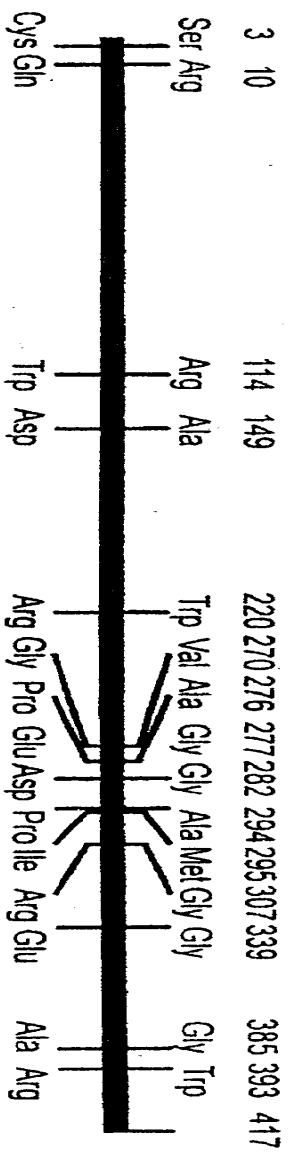
27. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, caracterizado pelo fato de que, no caso em que somente um ciclo 25 de seleção é empregado para a identificação, o número de moléculas do primeiro polipeptídeo D fraco está em excesso molar sobre o número de partículas de fagos.

28. Processo para a avaliação de afinidade, avidéz e/ou reatividade 30 de anticorpos monoclonais anti-D ou de antissoro policlonal Anti-D ou de antiglobulina ou de antissoro antiglobulina-humana, ou de preparações dos mesmos, caracterizado pelo fato de que compreende utilizar células, preferivelmente glóbulos vermelhos, compreendendo um ácido nucleico co-

dificando um antígeno Rhesus D contribuindo ou indicativo de um fenótipo D fraco como definido na reivindicação 1 ou 2.

29. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um oligonucleotídeo consistindo em um segmento de 12 a 50 nucleotídeos consecutivos da molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 1 ou 2, em que o referido segmento compreende pelo menos uma das posições 8, 29, 48, 340, 446, 544, 594, 602, 658, 667, 809, 819, 826, 830, 845, 880, 885, 919, 1016, 1154 e 1177; e em que o referido oligonucleotídeo está contido em uma embalagem.

FIG 1



2/5

1	20	40	60
ATG AGC TCT AAG TAC CCG CGG TCT GTC CGG CGC TGC CTG CCC CTC TGG GCC CTA ACA CTG			
Met Ser Ser Lys Tyr Pro Arg Ser Val Arg Arg Cys Leu Pro Leu Trp Ala Leu Thr Leu			
1	10		20
80	100	120	
GAA GCA GCT CTC ATT CTC CTC TTC TAT TTT TTT ACC CAC TAT GAC GCT TCC TTA GAG GAT			
Glu Ala Ala Leu Ile Leu Leu Phe Tyr Phe Phe Thr His Tyr Asp Ala Ser Leu Glu Asp			
	30		40
140	160	180	
CAA AAG GGG CTC GTG GCA TCC TAT CAA GTT GGC CAA GAT CTG ACC GTG ATG GCG GCC ATT			
Gln Lys Gly Leu Val Ala Ser Tyr Gln Val Gly Gln Asp Leu Thr Val Met Ala Ala Ile			
	50		60
200	220	240	
GGC TTG GGC TTC CTC ACC TCG AGT TTC CGG AGA CAC AGC TGG AGC AGT GTG GCC TTC AAC			
Gly Leu Gly Phe Leu Thr Ser Ser Phe Arg Arg His Ser Trp Ser Ser Val Ala Phe Asn			
	70		80
260	280	300	
CTC TTC ATG CTG GCG CTT GGT GTG CAG TGG GCA ATC CTG CTG GAC GGC TTC CTG AGC CAG			
Leu Phe Met Leu Ala Leu Gly Val Gln Trp Ala Ile Leu Leu Asp Gly Phe Leu Ser Gln			
	90		100
320	340	360	
TTC CCT TCT GGG AAG GTG GTC ATC ACA CTG TTC AGT ATT CGG CTG GCC ACC ATG AGT GCT			
Phe Pro Ser Gly Lys Val Val Ile Thr Leu Phe Ser Ile Arg Leu Ala Thr Met Ser Ala			
	110		120
380	400	420	
TTG TCG GTG CTG ATC TCA GTG GAT GCT GTC TTG GGG AAG GTC AAC TTG GCG CAG TTG GTG			
Leu Ser Val Leu Ile Ser Val Asp Ala Val Leu Gly Lys Val Asn Leu Ala Gln Leu Val			
	130		140
440	460	480	
GTG ATG GTG CTG GTG GAG GTG ACA GCT TTA GGC AAC CTG AGG ATG GTC ATC AGT AAT ATC			
Val Met Val Leu Val Glu Val Thr Ala Leu Gly Asn Leu Arg Met Val Ile Ser Asn Ile			
	150		160
500	520	540	
TTC AAC ACA GAC TAC CAC ATG AAC ATG ATG CAC ATC TAC GTG TTC GCA GCC TAT TTT GGG			
Phe Asn Thr Asp Tyr His Met Asn Met Met His Ile Tyr Val Phe Ala Ala Tyr Phe Gly			
	170		180
560	580	600	
CTG TCT GTG GCC TGG TGC CTG CCA AAG CCT CTA CCC GAG GGA ACG GAG GAT AAA GAT CAG			
Leu Ser Val Ala Trp Cys Leu Pro Lys Pro Leu Pro Glu Gly Thr Glu Asp Lys Asp Gln			
	190		200
620	640	660	
ACA GCA ACG ATA CCC AGT TTG TCT GCC ATG CTG GGC GCC CTC TTC TTG TGG ATG TTC TGG			
Thr Ala Thr Ile Pro Ser Leu Ser Ala Met Leu Gly Ala Leu Phe Leu Trp Met Phe Trp			
	210		220

FIG 2

680	700	720
CCA AGT TTC AAC TCT GCT CTG CTG AGA AGT CCA ATC GAA AGG AAG AAT GCC GTG TTC AAC		
Pro Ser Phe Asn Ser Ala Leu Leu Arg Ser Pro Ile Glu Arg Lys Asn Ala Val Phe Asn		
230		240
740	760	780
ACC TAC TAT GCT GTA GCA GTC AGC GTG GTG ACA GCC ATC TCA GGG TCA TCC TTG GCT CAC		
Thr Tyr Tyr Ala Val Ala Val Ser Val Val Thr Ala Ile Ser Gly Ser Ser Leu Ala His		
250		260
800	820	840
CCC CAA GGG AAG ATC AGC AAG ACT TAT GTG CAC AGT GCG GTG TTG GCA GGA GGC GTG GCT		
Pro Gln Gly Lys Ile Ser Lys Thr Tyr Val His Ser Ala Val Leu Ala Gly Gly Val Ala		
270		280
860	880	900
GTG GGT ACC TCG TGT CAC CTG ATC CCT TCT CCG TGG CTT GCC ATG GTG CTG GGT CTT GTG		
Val Gly Thr Ser Cys His Leu Ile Pro Ser Pro Trp Leu Ala Met Val Leu Gly Leu Val		
290		300
920	940	960
GCT GGG CTG ATC TCC GTC GGG GGA GCC AAG TAC CTG CCG GGG TGT TGT AAC CGA GTG CTG		
Ala Gly Leu Ile Ser Val Gly Gly Ala Lys Tyr Leu Pro Gly Cys Cys Asn Arg Val Leu		
310		320
980	1000	1020
GGG ATT CCC CAC AGC TCC ATC ATG GGC TAC AAC TTC AGC TTG CTG GGT CTG CTT GGA GAG		
Gly Ile Pro His Ser Ser Ile Met Gly Tyr Asn Phe Ser Leu Leu Gly Leu Leu Gly Glu		
330		340
1040	1060	1080
ATC ATC TAC ATT GTG CTG CTG GTG CTT GAT ACC GTC GGA GCC GGC AAT GGC ATG ATT GGC		
Ile Ile Tyr Ile Val Leu Leu Val Leu Asp Thr Val Gly Ala Gly Asn Gly Met Ile Gly		
350		360
1100	1120	1140
TTC CAG GTC CTC CTC AGC ATT GGG GAA CTC AGC TTG GCC ATC GTG ATA GCT CTC ACG TCT		
Phe Gln Val Leu Leu Ser Ile Gly Glu Leu Ser Leu Ala Ile Val Ile Ala Leu Thr Ser		
370		380
1160	1180	1200
GGT CTC CTG ACA GGT TTG CTC CTA AAT CTT AAA ATA TGG AAA GCA CCT CAT GAG GCT AAA		
Gly Leu Leu Thr Gly Leu Leu Leu Asn Leu Lys Ile Trp Lys Ala Pro His Glu Ala Lys		
390		400
1220	1240	1251
TAT TTT GAT GAC CAA GTT TTC TGG AAG TTT CCT CAT TTG GCT GTT GGA TTT TAA		
Tyr Phe Asp Asp Gln Val Phe Trp Lys Phe Pro His Leu Ala Val Gly Phe ***		
410		417

FIG 2 (Continuação)

	10	20	30	40	50	
RHCE	AGGCACTTCA	AGGCTTTGAG	TGTCACTGGC	CTCATCTGTA	AAGTGAGAA	650
RHD	-----	-----	-----	-----	-----G-----	
RHCE	TAAGAGATGG	TGCATGTAAA	GTGCTTAAGC	GGGACTAAAT	GCTAGGCAAA	700
RHD	-----	-----	-----	-----	-----	
RHCE	CATTAGCTGC	TGCTATTAGT	ACAGAGAGAG	AATGCTGTGT	GTGAGTCTTG	750
RHD	-----	-----	-A-----	G-----	-----	
RHCE	TGGGCAGAGA	TGGGTGAGAG	GGGAGACAAA	ACAAGTTCTC	ATGATGATGG	800
RHD	-----	-----	-----	-----	-----	
RHCE	GGGCAGGGGG	TCCAGCTGGT	GGTGTGGGAG	GGAACTCTGG	ACAGACCACT	850
RHD	---A-----C	-----	-----	-----	-----	
RHCE	GGTGGGGCTC	GGGTGGGAGC	CACTGGGGGG	GCTGGAGTGG	AAAGAATGTC	900
RHD	-----	-----	-----	-----	-----	
RHCE	GGCACAGATG	ACAGCTTCAG	AGCAGAATTC	AGTGCTAAGA	GGAACTGAGT	950
RHD	-----	-----	-----	-----	-----	
RHCE	GGCCATGAGT	TCCATGGTCA	CAGAAATCTT	AAGACACCTA	GCAAGGCAGG	1000
RHD	-----	-----	-----	-----C-	-----	
RHCE	AGTGGGTGTC	AGCTCAGGGA	AGCTCAGAGG	CTAAACCTAG	GTGAGAGCTG	1050
RHD	-----	-A-----	---C-----	---T-----	-----	
RHCE	AGGCTGTCAG	ATAAGAGCAA	GGCAAGGCTC	GGTTTCTGGA	GTAGTGAAGG	1100
RHD	-----	-----	-----	-----	-C-----	
RHCE	ACATAGCAGA	GCTATAACCC	AGGAACAAGG	CCCAGCTTAT	TGGAACTGGG	1150
RHD	-----	---G----	-----	-----	---A-----	
RHCE	ACCAGTCACA	CAGGGTGSCA	CAGGCACCAA	GTAGCCCAAT	ATAATAATAA	1200
RHD	C-----	-----	-----	-----	-----	
RHCE	AAACATAAAC	AATGATTTAT	GTCTATTGGG	CATTTATTCA	TGTTCTATGC	1250
RHD	-----	-----G-	---C----	-----	-----	
RHCE	CAGACACTGG	ACTAAGAGCT	TTATATGTGG	AAACTCATTT	AATCCTTACA	1300
RHD	-----	G-----	-----	-----	-----	

FIG 3

5/5

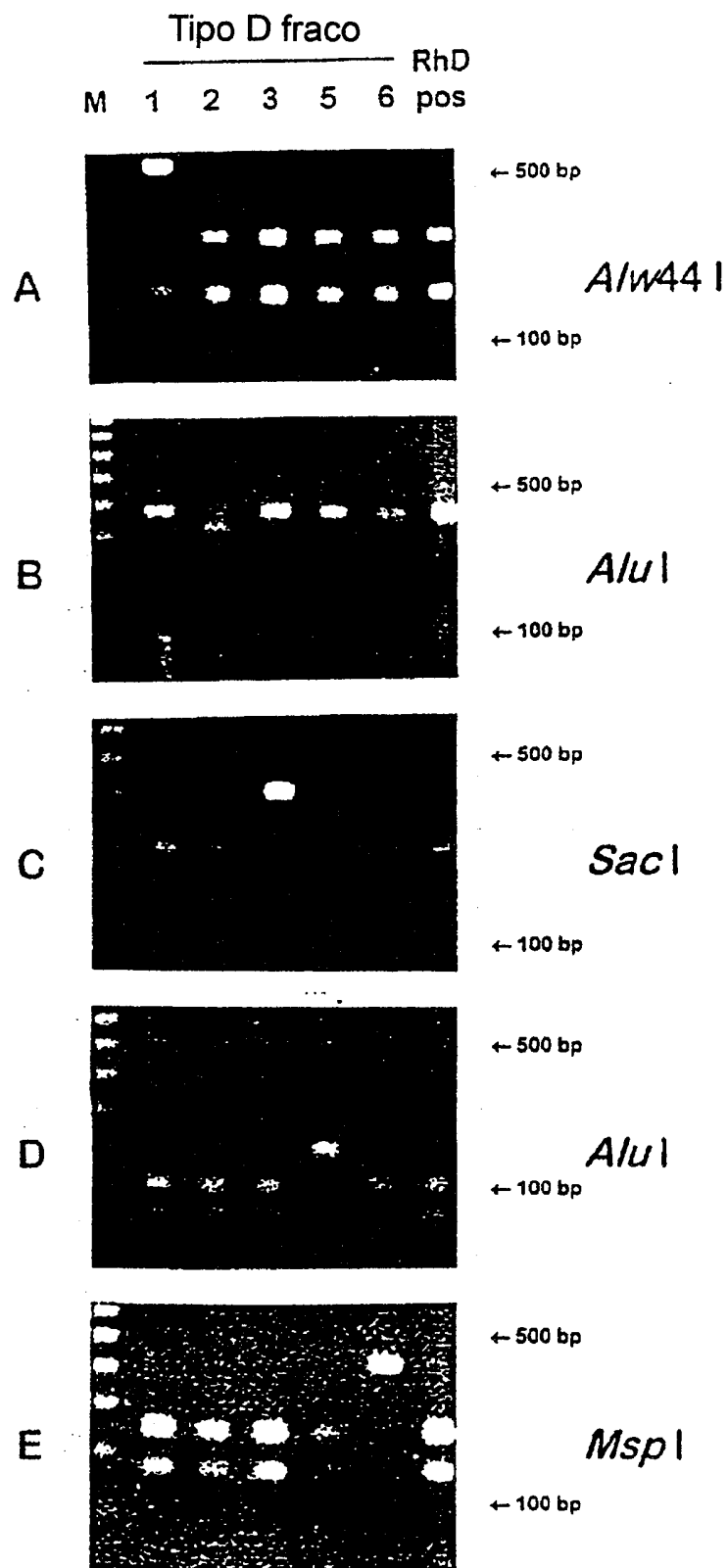


FIG 4

RESUMO

Patente de Invenção: **"VETOR COMPREENDENDO UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANDO UM ANTÍGENO RHESUS D FRACO, BACTÉRIA OU LEVEDURA COMPREENDENDO O MESMO, BEM COMO**
5 **PROCESSOS DE PRODUÇÃO DO REFERIDO ANTÍGENO, PARA TESTAR A PRESENÇA DE TAL MOLÉCULA, PARA A CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS OU ANTI-SORO, IDENTIFICAÇÃO DE CADEIAS V_H OU V_L OU DE UM ANTICORPO, DE AVALIAÇÃO DE AFINIDADE, AVIDEZ E/OU REATIVIDADE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-D**
10 **OU DE ANTISSORO POLICLONAL ANTI-D OU DE ANTIGLOBULINA OU DE ANTISSORO ANTIGLOBULINA-HUMANA, USO DO REFERÍDO ÁCIDO NUCLEICO E KIT".**

A presente invenção refere-se a novas moléculas de ácido nucléico codificando um antígeno Rhesus D contribuindo para o fenótipo D fraco que são caracterizadas por uma ou uma combinação de mutações de sentido errado ou por uma conversão de gene envolvendo exons 6 a 9 dos genes *RHD* e *RHCE*. A presente invenção ainda refere-se a vetores compreendendo as moléculas de ácido nucléico da invenção, a hospedeiros transformados com referidos vetores, a proteínas codificadas por referidas
15 moléculas de ácido nucléico e a processo para produzir estes polipeptídeos. O fato que as mutações de sentido errado mudam e a conversão referida acima podem estar diretamente correlacionados com o fenótipo D fraco que tem um impacto significativo sobre o teste de rotina de amostras de sangue. Por exemplo, oligonucleotídeos e anticorpos podem agora ser projetados
20 que geralmente permite a detecção de fenótipos D fraco em uma amostra. Estes oligonucleotídeos, anticorpos assim como uma variedade de processos diagnósticos estão todos no escopo da presente invenção. Os antígenos RHD codificados pelas novas moléculas de ácido nucléico podem ser usados para a caracterização, padronização e controle de qualidade de anti-
25 soro anti-D monoclonal e policlonal. Finalmente, a invenção refere-se a um kit utilizável para testar a presença de fenótipos D fraco.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> DRK-Blutspendedienst Baden-Wurttemberg-Hessen gemeinnutzige GmbH

<120> VETOR COMPREENDENDO UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANDO UM ANTÍGENO RHESUS D FRACO, BACTÉRIA OU LEVEDURA COMPREENDENDO O MESMO, BEM COMO PROCESSOS DE PRODUÇÃO DO REFERIDO ANTÍGENO, PARA TESTAR A PRESENÇA DE TAL MOLÉCULA, PARA A CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS OU ANTI-SORO, IDENTIFICAÇÃO DE CADEIAS VH OU VL OU DE UM ANTICORPO, DE AVALIAÇÃO DE AFINIDADE, AVIDEZ E/OU REATIVIDADE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-D OU DE ANTISORO POLICLONAL ANTI-D OU DE ANTIGLOBULINA OU DE ANTISORO ANTIGLOBULINA-HUMANA, USO DO REFERÍDO ÁCIDO NUCLEICO E KIT

<130> P105028

<140> PI9815090-1

<141> 18/12/1998

<150> EP 98 10 1203.2

<151> 23/01/1998

<160> 45

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo

<400> 1

gtgccacttg acttgggact

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo

<400> 2

atctctccaa gcagaccag caagc

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 3

tacctttgaa ttaagcactt cacag

25

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 4

tcctgaacct gctctgtgaa gtgc

24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 5

ctagagccaa acccacatct cctt

24

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 6
ttattggcta cttggtgcc 19

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotideo

<400> 7
tcctggctct ccctctct 18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotideo

<400> 8
aggtccctcc tccagcac 18

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotideo

<400> 9
cccaggtccc tcctcccagc ac 22

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotideo

<400> 10
 gggagatttt ttcagccag 19

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 11
 agacctttgg agcaggagtg 20

<210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 12
 agcagggagg atgttacag 19

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 13
 aggggtgggt agggaatatg 20

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 14

gcttgaaata gaagggaaat gggagg

26

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 15

tggcaagaac ctggaccttg acttt

25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 16

ccaggttggt aagcattgct gtacc

25

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 17

atagagaggc cagcacia

18

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 18
 tgtaactatg aggagtcag 19

 <210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 19
 agaagatggg ggaatctttt tcct 24

 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 20
 attagccggg cacggtggca 20

 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 21
 actctaattt cataaccacc 20

 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 22

aaaggatgca ggaggaatgt aggc

24

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 23

tgatgaccat cctcaggt

18

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 24

tctcagctca ctgcaacctc

20

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 25

catccccctt tgggtggcc

18

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 26
 acccagcaag ctgaagttgt agcc 24

 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 27
 cctttttgtc cctgatgacc 20

 <210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 28
 tatccatgag gtgctgggaa c 21

 <210> 29
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 29
 aaggtagggg ctggacag 18

 <210> 30
 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 30

aaaaatcctg tgctccaaac

20

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 31

gagattaata atcctgtgct cca

23

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 32

caagagatca agccaaaatc agt

23

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 33

cacccgcatg tcagactatt tggc

24

<210> 34

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 34
 caaaaaccca ttcttcccg 19

<210> 35
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 35
 tgtattccag gcagaaggc 19

<210> 36
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 36
 gcacagagac ggacacag 18

<210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 37
 acgtacaaat gcaggcaac 19

<210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotídeo

 <400> 38
 tgttggagag aggggtgatg 20

 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotídeo

 <400> 39
 cagtctgttg tttaccagat g 21

 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotídeo

 <400> 40
 agcttactgg atgaccacca 20

 <210> 41
 <211> 1254
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sequência de cDNA e sequência prevista de aminoácidos do alelo
 prevalente do gene RHD (Figura 2)

 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1254)

<400> 41

atg agc tct aag tac ccg cgg tct gtc cgg cgc tgc ctg ccc ctc tgg 48
Met Ser Ser Lys Tyr Pro Arg Ser Val Arg Arg Cys Leu Pro Leu Trp
1 5 10 15

gcc cta aca ctg gaa gca gct ctc att ctc ctc ttc tat ttt ttt acc 96
Ala Leu Thr Leu Glu Ala Ala Leu Ile Leu Leu Phe Tyr Phe Phe Thr
20 25 30

cac tat gac gct tcc tta gag gat caa aag ggg ctc gtg gca tcc tat 144
 His Tyr Asp Ala Ser Leu Glu Asp Gln Lys Gly Leu Val Ala Ser Tyr
 35 40 45

caa gtt ggc caa gat ctg acc gtg atg gcg gcc att ggc ttg ggc ttc 192
Gln Val Gly Gln Asp Leu Thr Val Met Ala Ala Ile Gly Leu Gly Phe
50 55 60

ctc acc tcg agt ttc cgg aga cac agc tgg agc agt gtg gcc ttc aac 240
Leu Thr Ser Ser Phe Arg Arg His Ser Trp Ser Ser Val Ala Phe Asn
65 70 75 80

ctc ttc atg ctg gcg ctt ggt gtg cag tgg gca atc ctg ctg gac ggc 288
Leu Phe Met Leu Ala Leu Gly Val Gln Trp Ala Ile Leu Leu Asp Gly
85 90 95

```

ttc ctg agc cag ttc cct tct ggg aag gtg gtc atc aca ctg ttc agt      336
Phe Leu Ser Gln Phe Pro Ser Gly Lys Val Val Ile Thr Leu Phe Ser
      100              105              110

```

att cgg ctg gcc acc atg agt gct ttg tcg gtg ctg atc tca gtg gat 384
Ile Arg Leu Ala Thr Met Ser Ala Leu Ser Val Leu Ile Ser Val Asp
115 120 125

gct gtc ttg ggg aag gtc aac ttg gcg cag ttg gtg gtg atg gtg ctg 432
Ala Val Leu Gly Lys Val Asn Leu Ala Gln Leu Val Val Met Val Leu
130 135 140

gtg gag gtg aca gct tta ggc aac ctg agg atg gtc atc agt aat atc 480
Val Glu Val Thr Ala Leu Gly Asn Leu Arg Met Val Ile Ser Asn Ile
145 150 155 160

```

ttc aac aca gac tac cac atg aac atg atg cac atc tac gtg ttc gca      528
Phe Asn Thr Asp Tyr His Met Asn Met Met His Ile Tyr Val Phe Ala
          165              170              175

```

gcc tat ttt ggg ctg tct gtg gcc tgg tgc ctg cca aag cct cta ccc	576
Ala Tyr Phe Gly Leu Ser Val Ala Trp Cys Leu Pro Lys Pro Leu Pro	
180 185 190	
gag gga acg gag gat aaa gat cag aca gca acg ata ccc agt ttg tct	624
Glu Gly Thr Glu Asp Lys Asp Gln Thr Ala Thr Ile Pro Ser Leu Ser	
195 200 205	
gcc atg ctg ggc gcc ctc ttc ttg tgg atg ttc tgg cca agt ttc aac	672
Ala Met Leu Gly Ala Leu Phe Leu Trp Met Phe Trp Pro Ser Phe Asn	
210 215 220	
tct gct ctg ctg aga agt cca atc gaa agg aag aat gcc gtg ttc aac	720
Ser Ala Leu Leu Arg Ser Pro Ile Glu Arg Lys Asn Ala Val Phe Asn	
225 230 235 240	
acc tac tat gct gta gca gtc agc gtg gtg aca gcc atc tca ggg tca	768
Thr Tyr Tyr Ala Val Ala Val Ser Val Val Thr Ala Ile Ser Gly Ser	
245 250 255	
tcc ttg gct cac ccc caa ggg aag atc agc aag act tat gtg cac agt	816
Ser Leu Ala His Pro Gln Gly Lys Ile Ser Lys Thr Tyr Val His Ser	
260 265 270	
gcg gtg ttg gca gga ggc gtg gct gtg ggt acc tcg tgt cac ctg atc	864
Ala Val Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Gly Thr Ser Cys His Leu Ile	
275 280 285	
cct tct ccg tgg ctt gcc atg gtg ctg ggt ctt gtg gct ggg ctg atc	912
Pro Ser Pro Trp Leu Ala Met Val Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Ile	
290 295 300	
tcc gtc ggg gga gcc aag tac ctg ccg ggg tgt tgt aac cga gtg ctg	960
Ser Val Gly Gly Ala Lys Tyr Leu Pro Gly Cys Cys Asn Arg Val Leu	
305 310 315 320	
ggg att ccc cac agc tcc atc atg ggc tac aac ttc agc ttg ctg ggt	1008
Gly Ile Pro His Ser Ser Ile Met Gly Tyr Asn Phe Ser Leu Leu Gly	
325 330 335	
ctg ctt gga gag atc atc tac att gtg ctg ctg gtg ctt gat acc gtc	1056
Leu Leu Gly Glu Ile Ile Tyr Ile Val Leu Leu Val Leu Asp Thr Val	
340 345 350	
gga gcc ggc aat ggc atg att ggc ttc cag gtc ctc ctc agc att ggg	1104
Gly Ala Gly Asn Gly Met Ile Gly Phe Gln Val Leu Leu Ser Ile Gly	

355	360	365	
gaa ctc agc ttg gcc atc gtg ata gct ctc acg tct ggt ctc ctg aca			1152
Glu Leu Ser Leu Ala Ile Val Ile Ala Leu Thr Ser Gly Leu Leu Thr			
370	375	380	
ggt ttg ctc cta aat ctt aaa ata tgg aaa gca cct cat gag gct aaa			1200
Gly Leu Leu Leu Asn Leu Lys Ile Trp Lys Ala Pro His Glu Ala Lys			
385	390	395	400
tat ttt gat gac caa gtt ttc tgg aag ttt cct cat ttg gct gtt gga			1248
Tyr Phe Asp Asp Gln Val Phe Trp Lys Phe Pro His Leu Ala Val Gly			
	405	410	415
ttt taa			1254
Phe			
<210> 42			
<211> 417			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Sequência prevista de aminoácidos do alelo prevalente do gene			
RHD (Figura 2)			
<400> 42			
Met Ser Ser Lys Tyr Pro Arg Ser Val Arg Arg Cys Leu Pro Leu Trp			
1	5	10	15
Ala Leu Thr Leu Glu Ala Ala Leu Ile Leu Leu Phe Tyr Phe Phe Thr			
	20	25	30
His Tyr Asp Ala Ser Leu Glu Asp Gln Lys Gly Leu Val Ala Ser Tyr			
	35	40	45
Gln Val Gly Gln Asp Leu Thr Val Met Ala Ala Ile Gly Leu Gly Phe			
50	55	60	
Leu Thr Ser Ser Phe Arg Arg His Ser Trp Ser Ser Val Ala Phe Asn			

65	70					75					80				
Leu	Phe	Met	Leu	Ala	Leu	Gly	Val	Gln	Trp	Ala	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly
85				90				95							
Phe	Leu	Ser	Gln	Phe	Pro	Ser	Gly	Lys	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Phe	Ser
100				105				110							
Ile	Arg	Leu	Ala	Thr	Met	Ser	Ala	Leu	Ser	Val	Leu	Ile	Ser	Val	Asp
115				120				125							
Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Val	Asn	Leu	Ala	Gln	Leu	Val	Val	Met	Val	Leu
130				135				140							
Val	Glu	Val	Thr	Ala	Leu	Gly	Asn	Leu	Arg	Met	Val	Ile	Ser	Asn	Ile
145				150				155				160			
Phe	Asn	Thr	Asp	Tyr	His	Met	Asn	Met	Met	His	Ile	Tyr	Val	Phe	Ala
165				170				175							
Ala	Tyr	Phe	Gly	Leu	Ser	Val	Ala	Trp	Cys	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	Pro
180				185				190							
Glu	Gly	Thr	Glu	Asp	Lys	Asp	Gln	Thr	Ala	Thr	Ile	Pro	Ser	Leu	Ser
195				200				205							
Ala	Met	Leu	Gly	Ala	Leu	Phe	Leu	Trp	Met	Phe	Trp	Pro	Ser	Phe	Asn
210				215				220							
Ser	Ala	Leu	Leu	Arg	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Lys	Asn	Ala	Val	Phe	Asn
225				230				235				240			
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Val	Ala	Val	Ser	Val	Val	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser
245				250				255							

Ser Leu Ala His Pro Gln Gly Lys Ile Ser Lys Thr Tyr Val His Ser
 260 265 270

Ala Val Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Gly Thr Ser Cys His Leu Ile
 275 280 285

Pro Ser Pro Trp Leu Ala Met Val Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Ile
 290 295 300

Ser Val Gly Gly Ala Lys Tyr Leu Pro Gly Cys Cys Asn Arg Val Leu
 305 310 315 320

Gly Ile Pro His Ser Ser Ile Met Gly Tyr Asn Phe Ser Leu Leu Gly
 325 330 335

Leu Leu Gly Glu Ile Ile Tyr Ile Val Leu Leu Val Leu Asp Thr Val
 340 345 350

Gly Ala Gly Asn Gly Met Ile Gly Phe Gln Val Leu Leu Ser Ile Gly
 355 360 365

Glu Leu Ser Leu Ala Ile Val Ile Ala Leu Thr Ser Gly Leu Leu Thr
 370 375 380

Gly Leu Leu Leu Asn Leu Lys Ile Trp Lys Ala Pro His Glu Ala Lys
 385 390 395 400

Tyr Phe Asp Asp Gln Val Phe Trp Lys Phe Pro His Leu Ala Val Gly
 405 410 415

Phe

<210> 43

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Parte do íntron 5 dos genes RHCE e RHD (Figura 3)

<400> 43

```

agccacttca acgttttgag tctcagtggc ctcatctgta aagtgagaat taagagatgg      60
tgcatgtaaa gtgcttaacg gggagtaaat ggtaggcaaa cattagctgc tgctattagt      120
acagagagac aatgggtgtgt gtgagtcctt tgggcagaga tgggtgagag gggagacaaa      180
acaagttctc atgatgatgg gggcaggggg tccagctggg ggtgtcggag ggaagtctgg      240
acagaccagt ggtggggctc ggggtgggag cactgggggg gctggagtgg aaagaatgtg      300
gccacagatg acagcttcac agcagaattc agtgctaaga ggaagtgagt ggccatgagt      360
tccatggtga cagaaagtct aagacaccta gcaaggcagg agtgggtgtc agctcagggg      420
agctcagagg ctaaacttag gtgagagctg aggggtgtcag ataagagcaa ggcaaggctc      480
cggttcttga gtagtgaagg acatagcaga gctataaccc aggaacaagg cccagcttat      540
tggaactggg accagtcaca caggggtggc caggcaccaa gtagccaata ataataataa      600
aaacaataac aatgatttat gtctattggg catttattca tgttctatgc cagacactgg      660
actaagagct ttatatgtgg aaactcattt aatccttaca                               700

```

<210> 44

<211> 417

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Variantes apresentando o fenótipo D fraco (Figura 1)

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> pode ser também Cys

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)
<223> pode ser também Gln

<220>
<221> VARIANT
<222> (114)..(114)
<223> pode ser também Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (149)..(149)
<223> pode ser também Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (220)..(220)
<223> pode ser também Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (270)..(270)
<223> pode ser também Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (276)..(276)
<223> pode ser também Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> (277)..(277)
<223> pode ser também Glu

<220>
<221> VARIANT
<222> (282)..(282)
<223> pode ser também Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> (294)..(294)
<223> pode ser também Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> (295)..(295)
<223> pode ser também Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> (307)..(307)

<223> pode ser também Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (339)..(339)

<223> pode ser também Glu

<220>

<221> VARIANT

<222> (393)..(393)

<223> pode ser também Arg

<400> 44

Met	Ser	Ser	Lys	Tyr	Pro	Arg	Ser	Val	Arg	Arg	Cys	Leu	Pro	Leu	Trp
1				5					10					15	

Ala	Leu	Thr	Leu	Glu	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	Phe	Tyr	Phe	Phe	Thr
			20					25					30		

His	Tyr	Asp	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Gln	Lys	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Tyr
		35					40					45			

Gln	Val	Gly	Gln	Asp	Leu	Thr	Val	Met	Ala	Ala	Ile	Gly	Leu	Gly	Phe
	50					55					60				

Leu	Thr	Ser	Ser	Phe	Arg	Arg	His	Ser	Trp	Ser	Ser	Val	Ala	Phe	Asn
65					70					75					80

Leu	Phe	Met	Leu	Ala	Leu	Gly	Val	Gln	Trp	Ala	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly
				85					90					95	

Phe	Leu	Ser	Gln	Phe	Pro	Ser	Gly	Lys	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Phe	Ser
			100					105						110	

Ile	Arg	Leu	Ala	Thr	Met	Ser	Ala	Leu	Ser	Val	Leu	Ile	Ser	Val	Asp
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

115		120		125
Ala Val Leu Gly Lys Val Asn Leu Ala Gln Leu Val Val Met Val Leu				
130		135		140
Val Glu Val Thr Ala Leu Gly Asn Leu Arg Met Val Ile Ser Asn Ile				
145		150		155 160
Phe Asn Thr Asp Tyr His Met Asn Met Met His Ile Tyr Val Phe Ala				
	165		170	175
Ala Tyr Phe Gly Leu Ser Val Ala Trp Cys Leu Pro Lys Pro Leu Pro				
	180		185	190
Glu Gly Thr Glu Asp Lys Asp Gln Thr Ala Thr Ile Pro Ser Leu Ser				
	195		200	205
Ala Met Leu Gly Ala Leu Phe Leu Trp Met Phe Trp Pro Ser Phe Asn				
	210		215	220
Ser Ala Leu Leu Arg Ser Pro Ile Glu Arg Lys Asn Ala Val Phe Asn				
225		230		235 240
Thr Tyr Tyr Ala Val Ala Val Ser Val Val Thr Ala Ile Ser Gly Ser				
	245		250	255
Ser Leu Ala His Pro Gln Gly Lys Ile Ser Lys Thr Tyr Val His Ser				
	260		265	270
Ala Val Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Gly Thr Ser Cys His Leu Ile				
	275		280	285
Pro Ser Pro Trp Leu Ala Met Val Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Ile				
	290		295	300

Ser Val Gly Gly Ala Lys Tyr Leu Pro Gly Cys Cys Asn Arg Val Leu
 305 310 315 320

Gly Ile Pro His Ser Ser Ile Met Gly Tyr Asn Phe Ser Leu Leu Gly
 325 330 335

Leu Leu Gly Glu Ile Ile Tyr Ile Val Leu Leu Val Leu Asp Thr Val
 340 345 350

Gly Ala Gly Asn Gly Met Ile Gly Phe Gln Val Leu Leu Ser Ile Gly
 355 360 365

Glu Leu Ser Leu Ala Ile Val Ile Ala Leu Thr Ser Gly Leu Leu Thr
 370 375 380

Gly Leu Leu Leu Asn Leu Lys Ile Trp Lys Ala Pro His Glu Ala Lys
 385 390 395 400

Tyr Phe Asp Asp Gln Val Phe Trp Lys Phe Pro His Leu Ala Val Gly
 405 410 415

Phe

<210> 45

<211> 700

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Parte do íntron 5 dos genes RHCE e RHD com mutações (Figura 3)

<220>

<221> variation

<222> (46)..(46)

<223> pode ser também g

<220>

<221> variation
 <222> (122)..(122)
 <223> pode ser também a

<220>
 <221> variation
 <222> (131)..(131)
 <223> pode ser também g

<220>
 <221> variation
 <222> (204)..(204)
 <223> pode ser também a

<220>
 <221> variation
 <222> (210)..(210)
 <223> pode ser também c

<220>
 <221> variation
 <222> (389)..(389)
 <223> pode ser também c

<220>
 <221> variation
 <222> (412)..(412)
 <223> pode ser também a

<220>
 <221> variation
 <222> (424)..(424)
 <223> pode ser também c

<220>
 <221> variation
 <222> (435)..(435)
 <223> pode ser também t

<220>
 <221> variation
 <222> (492)..(492)
 <223> pode ser também c

<220>
 <221> variation
 <222> (516)..(516)

<223> pode ser também g

<220>

<221> variation

<222> (543)..(543)

<223> pode ser também a

<220>

<221> variation

<222> (551)..(551)

<223> pode ser também c

<220>

<221> variation

<222> (619)..(619)

<223> pode ser também g

<220>

<221> variation

<222> (626)..(626)

<223> pode ser também c

<220>

<221> variation

<222> (661)..(661)

<223> pode ser também g

<400> 45

agccacttca acgttttgag tctcagtggc ctcatctgta aagtgagaat taagagatgg 60

tgcatgtaaa gtgcttaacg gggagtaaat ggtaggcaaa cattagctgc tgctattagt 120

acagagagac aatgggtgtgt gtgagtcttg tgggcagaga tgggtgagag gggagacaaa 180

acaagttctc atgatgatgg gggcaggggg tccagctggg ggtgtcggag ggaagtctgg 240

acagaccagt ggtggggctc ggggtgggagg cactgggggg gctggagtggt aaagaatgtg 300

gccacagatg acagcttcac agcagaattc agtgctaaga ggaagtgagt ggccatgagt 360

tccatggtga cagaaagtct aagacaccta gcaaggcagg agtgggtgtc agctcagga 420

agctcagagg ctaaacttag gtgagagctg aggggtgtcag ataagagcaa ggcaaggctc 480

cggttctgga gtagtgaagg acatagcaga gctataaacc aggaacaagg cccagcttat 540

tggaactggg accagtcaca cagggtggca caggcaccaa gtagccaata ataataataa 600

aaacaataac aatgatttat gtctattggg catttattca tgttctatgc cagacactgg	660
actaagagct ttatatgtgg aaactcattt aatccttaca	700

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

Código de Controle

Campo 1



56CFF0FF79D4748F

Campo 2



5F414644E5AD47A2

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: p105028 26842505_1.txt
- Data de Geração do Código: 07-12-2015
- Hora de Geração do Código: 13:55:47
- Código de Controle:
 - Campo 1: 56CFF0FF79D4748F
 - Campo 2: 5F414644E5AD47A2