(11) Número de Publicação: **PT 727483 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 7/00 (2007.10) ***C12N 15/49*** (2007.10)
C07K 14/16 (2007.10) ***G01N 33/569*** (2007.10)
C12Q 1/70 (2007.10) ***A61K 39/21*** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1996.01.19**

(30) Prioridade(s): **1995.02.16 DE 19505262**

(43) Data de publicação do pedido: **1996.08.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.10.29**
006/2009

(73) Titular(es):
SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS PRODUCTS GMBH
GÖRZHÄUSER HOF EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76 35041 MARBURG **DE**

(72) Inventor(es):
JOSEF EBERLE **DE**
HANS-PETER HAUSER, DR. **DE**
STEFAN KNAPP, DR. **DE**
STEFAN BRUST, DR. **DE**
LUTZ G. GÜRTLER, PROF. DR. **DE**

(74) Mandatário:
MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **RETROVÍRUS DO GRUPO DOS VIH E SUA APLICAÇÃO**

(57) Resumo:

RESUMO

"RETROVÍRUS DO GRUPO DOS VIH E SUA APLICAÇÃO"

A invenção descreve um novo vírus da imunodeficiência que tem a designação de MVP-2901/94 e que foi depositado na Colecção Europeia de Culturas de Células Animais (ECACC) com o nº V 95012601. Também são descritos os antigénios característicos que podem ser obtidos a partir do vírus e que podem ser utilizados para detectar anticorpos contra retrovírus que estão associados a doenças de imunodeficiência, sendo descritas também as sequências parciais de ADN e de aminoácidos do vírus.

DESCRIÇÃO

"RETROVÍRUS DO GRUPO DOS VIH E SUA APLICAÇÃO"

A presente invenção diz respeito a um novo retrovírus do grupo dos VIH, presentemente designado, de forma mais precisa, por subtipo O dos VIH, e às suas variantes ou partes que contenham as propriedades essenciais do vírus. É descrito um processo para a criação dos retrovírus em cultura. A invenção também diz respeito ao isolamento deste retrovírus e à aplicação do vírus, das suas partes ou extractos para fins medicinais, para diagnóstico e para a preparação de vacinas.

Nos seres humanos infectados com retrovírus pertencentes ao chamado grupo dos VIH são observáveis doenças cujos sintomas podem ser agrupados sob o nome genérico de imunodeficiência ou SIDA (síndroma da imunodeficiência adquirida).

Estudos epidemiológicos permitiram verificar que o vírus da imunodeficiência humana (VIH) é o agente etiológico para a maioria significativa dos casos de SIDA (síndroma da imunodeficiência adquirida). Ao retrovírus isolado a partir de um paciente e caracterizado em 1983 foi atribuída a designação de HIV-1 (Barré-Sinoussi, F. *et al.*, Science 220, 868-871 [19833]). Há uma variante do HIV-1 descrita no documento WO 86/02383.

Há um segundo grupo de vírus da imunodeficiência humana que foi identificado na África Ocidental em 1985 (Clavel, F. *et al.*, Science 233, 343-346 [1986]) e que recebeu a designação de vírus de tipo 2 da imunodeficiência humana (HIV-2) (EP-A-O 239 425). Os retrovírus HIV-2 diferem nitidamente dos vírus HIV-1 mas também estão relacionados com os vírus da imunodeficiência dos macacos (SIV-2). Tal como sucede com o HIV-1, o HIV-2 também origina uma sintomatologia de SIDA.

Recentemente foram descritos novos vírus de IH, representados por ANT70 (J. Vir., 1994, Vol. 68, N° 3, pp. 1586-1869) e MVP-5180/91 (J. Vir., 1994, Vol. 68, N° 3, pp. 1581-1585) que não podem ser classificados nos subtipos A-F do HIV-1. Devido às suas nítidas diferenças estruturais, comparativamente com as estirpes conhecidas de HIV-1, aqueles dois isolados foram classificados provisória e conjuntamente como pertencentes ao subtipo O (G. Myers, Los Alamos Data base), embora sejam nitidamente diferentes entre si no que diz respeito às suas sequências nucleotídicas genómicas.

Uma das características dos vírus da imunodeficiência humana é o facto de exibirem um grau elevado de variabilidade que complica bastante a comparabilidade dos diferentes isolados. Ao fazer-se a comparação de diferentes isolados de HIV-1 são observados graus elevados de variabilidade, por exemplo, em algumas regiões do genoma, ao passo que há outras regiões do genoma que se encontram comparativamente bem conservadas (Benn, S. *et al.*, Science 230, 949-951 [1985]). Também foi já verificado que o HIV-2 apresenta um grau muito elevado de polimorfismo (Clavel, F. *et al.*, Nature 324, 691-695 [1986]). As regiões dos genes *gag* e *pol* que codificam proteínas que são estrutural e enzimaticamente essenciais possuem a maior estabilidade genética. Pelo contrário, algumas regiões do gene *env* e também dos genes (*vif*, *vpr*, *tat*, *ver*, *net*), que codificam proteínas reguladoras, apresentam um grau elevado de variabilidade.

Foi ainda demonstrado que os anti-soros contra o HIV-1 apresentam também uma reacção cruzada com produtos dos genes *gag* e *pol* do HIV-2 mesmo quando existem apenas diminutas homologias sequenciais. De igual modo, a hibridação entre estes dois vírus não foi manifestamente significativa, salvo quando utilizadas condições muito pouco restritivas (Clavel, F. *et al.*, Nature 324, 691-695 [1986]).

Devido à distribuição generalizada dos retrovírus do grupo dos VIH, e tendo em conta o facto de decorrer um período entre alguns e muitos anos (2-20) entre o momento da infecção e o momento em que são reconhecíveis sintomas bem definidos de alterações, é de enorme importância, do ponto de vista epidemiológico, identificar uma infecção com retrovírus do grupo dos VIH numa fase tão precoce quanto possível e, em particular, de uma maneira fiável. Isto é importante não só no diagnóstico de pacientes que manifestem sinais de imunodeficiência, mas também, e por maioria de razão, na despistagem de dadores de sangue. Chegou-se à conclusão de que ao utilizar retrovírus, ou seus componentes, dos tipos HIV-1 ou HIV-2 em sistemas de detecção, não se consegue detectar os anticorpos ou apenas se consegue detectá-los fracamente em alguns soros, ainda que ocorram sinais de imunodeficiência nos pacientes a partir dos quais esses soros foram obtidos. Em determinados casos tal detecção é possível utilizando os retrovírus do grupo dos VIH de acordo com a invenção.

A diversidade genotípica dos vírus do grupo dos VIH constitui, em particular, um problema importante para efeitos de diagnóstico. No caso dos vírus do tipo HIV-1, admite-se que seja modificado um nucleótido por genoma em cada ciclo de replicação. Em consequência desta variabilidade genética, os vírus do grupo dos VIH são capazes de responder, de uma maneira extraordinariamente flexível, à pressão selectiva *in vivo*, e de gerar, de uma forma extremamente rápida, mutantes que são resistentes aos agentes farmacológicos ou são capazes de atacar indivíduos que tenham desenvolvido um determinado grau de protecção imunitária (Sharp *et al.*, "Origins and diversity of human immunodeficiency viruses", AIDS 1994, vol. 8, Suppl. 1; S 27-S 42).

Para se evitar a disseminação de infecções, em particular em associação com as transfusões de sangue mas também em associação com a doação de órgãos, deve ser

possível confirmar uma infecção com vírus do grupo dos VIH, se possível, com uma certeza absoluta a 100%. Por este motivo, também é necessário, em termos de diagnóstico, detectar as infecções causadas por um vírus que apesar de estar vulgarmente distribuído por determinadas regiões geográficas seja capaz, sem dificuldade - a não ser que sejam tomadas medidas de precaução adequadas - de se propagar pela Europa ou pelos Estados Unidos da América.

Apresenta-se uma descrição do isolamento e da caracterização de um novo vírus da imunodeficiência humana, doravante aqui designado por MVP-2901/94, que foi isolado em 1994 a partir de linfócitos periféricos de uma mulher com 24 anos de idade, originária dos Camarões, que apresentava sinais de imunodeficiência. Sob o ponto de vista geográfico, este retrovírus tem a sua origem numa região de África que está localizada entre a África Ocidental, onde a infecção com os vírus HIV-1 e HIV-2 é endémica, e a África Oriental, onde é quase exclusivamente o vírus HIV-1 que aí se encontra disseminado. Em consequência, a presente invenção diz respeito a um novo retrovírus do subtipo O do grupo dos VIH, que é um retrovírus designado por MVP-2901/94, e às suas variantes, às sequências do seu ADN e às sequências dos seus aminoácidos e às sequências constituintes dos seus derivados e aos estojos de ensaio que contenham estes últimos.

O MVP-2901/94 pode ser propagado nas linhagens de células MT2 e de Jurkat. O isolamento e a propagação de vírus estão descritos minuciosamente na obra "Viral Quantification in. HIV Infection, Editor Jean-Marie Andrieu, John Libbey Eurotext, 1991". Considera-se os métodos processuais ali descritos incorporados por referência no texto do presente pedido de patente de invenção.

Para proporcionar uma melhor compreensão das diferenças entre o vírus MVP-2901/94, de acordo com a invenção, e os retrovírus HIV-1 e HIV-2, explicar-se-á em primeiro lugar, de uma forma abreviada, a estrutura dos retrovírus que causam a imunodeficiência. No centro dos vírus, o ARN está localizado num núcleo cónico que é resultante do agrupamento de subunidades proteínicas que recebem a designação de p24 (p como abreviatura de proteína). Este núcleo interior está envolvido por uma cobertura proteínica que é constituída a partir da proteína p17 (núcleo exterior) e por uma cobertura glicoproteínica que contém, para além de lípidos, cuja origem está na célula hospedeira, a proteína transmembranar gp 41 e a proteína de revestimento 120 (gp 120). Esta gp 120 liga-se então aos receptores CD-4 das células hospedeiras.

Tanto quanto se sabe, o ARN dos vírus do grupo dos VIH - dito de uma maneira simplificada - possui as regiões génicas seguintes: as chamadas repetições de terminal longo (LTR) em cada extremidade, conjuntamente com as seguintes regiões génicas: *gag*, *pol*, *env* e *nef*. O gene *gag* codifica, *inter alia*, as proteínas nucleares p 24 e p 17, o gene *pol* codifica a transcriptase inversa, a protease, a RNAse H e a integrase e o gene *env* codifica as glicoproteínas, gp 41 e gp 120, do revestimento de cobertura do vírus. O gene *nef* codifica uma proteína que possui uma função reguladora. A disposição do genoma dos retrovírus do tipo dos VIH está ilustrada esquematicamente na figura 1.

A técnica conhecida como PCR (reacção de polimerização em cadeia) passou a ser um método de manipulação genética que possui inúmeras aplicações possíveis e os componentes necessários para a prática do método podem ser adquiridos no mercado. Utilizando este método, é possível amplificar sequências de ADN se as regiões do ADN da sequência que se pretende amplificar forem conhecidas. Dito de forma abreviada, é então necessário sintetizar fragmentos de ADN

complementares (oligonucleótidos = iniciadores) que se recombinam com uma região curta da sequência de ácido nucleico que se pretende amplificar. Para a execução do ensaio, os ácidos nucleicos dos VIH são introduzidos conjuntamente com os iniciadores numa mistura de reacção que contém também uma polimerase e nucleósido-trifosfatos. A polimerização (síntese do ADN) decorre durante um período definido e as cadeias de ácidos nucleicos são depois separadas por aquecimento. Após o arrefecimento, efectua-se a polimerização mais uma vez. Assim sendo, se o retrovírus de acordo com a invenção for um vírus HIV-1 ou HIV-2, deve ser possível amplificar o ácido nucleico utilizando iniciadores que são conservados nas sequências conhecidas dos vírus HIV-1 e HIV-2. Alguns iniciadores deste tipo foram já anteriormente descritos (Lauré, F. *et al.*, Lacet ii, (1985) 538-541 para *pol* 3 e *pol* 4 e Ou C. Y. *et al.*, Science 239 (1988) 295-297 para *sk* 38/39, *sk* 68/69).

No entanto, estes iniciadores não servem para amplificar ADN proveniente do isolado MVP-5180 dos VIH (J. Vir., 1994, vol. 68, nº 3, pp. 1581-1858). De igual modo, a utilização destes iniciadores também fracassou quando se tentou amplificar ADN do isolado MVP-2901/94, o que levou à formulação da hipótese de que este isolado também diverge fortemente da sequência de consenso do HIV-1. Assim, foi necessário construir uma grande variedade de novos iniciadores que foram obtidos a partir de sequências conhecidas e que foram tão fortemente conservadas quanto possível e que vieram a ser utilizadas segundo tantas combinações quanto as possíveis ao mesmo tempo que se fazia variar as condições da reacção. Surpreendentemente, concluiu-se que era possível amplificar o ADN do MVP-2901/94, passando assim a ser possível uma primeira intrusão na sequência do isolado, utilizando uma combinação dos iniciadores 212 e 412 que foram obtidos a partir da sequência

do isolado MVP-5180/91, nas condições de reacção indicadas no Exemplo 4.

(Sequência. ID No. 1)

5' 3'

212 AGT GCA GCA GGT AGC ACT ATG

(Sequência. ID No. 2)

5' 3'

412 GTT CCA TTT TAC TGA TGT GTA

Logo que uma região constituinte da sequência de um vírus da IH tenha sido descodificada, tal como sucede no caso presente, todo o genoma do vírus pode ser clonado e sequenciado, utilizando métodos conhecidos convencionais da biologia molecular.

1) Isso pode ser efectuado, por exemplo, por clonagem de um ADNc do modo seguinte: provoca-se a precipitação do vírus a partir de um volume de cultura convenientemente dimensionado (aproximadamente 1 L) e depois recoloca-se em suspensão numa solução de cloreto de sódio tamponada com fosfato. Esta suspensão é depois granulada através de um leito de sacarose (20%). Coloca-se os grânulos virais em suspensão numa solução de cloreto de guanidínio 6 M em ditiotreitol 20 mM contendo 0,5% de Nonidet P 40. Acrescenta-se CsCl até se obter uma concentração 2 M e aplica-se a solução que contém o vírus desmembrado sobre um leito de cloreto de césio. O ARN viral é depois granulado por centrifugação, sendo dissolvido e extraído com fenol e precipitado com etanol e cloreto de lítio. A síntese da primeira cadeia de ADNc é efectuada sobre o ARN viral, ou partes suas, utilizando um iniciador oligo(dT). A síntese, para a qual se acrescenta transcriptase inversa, é efectuada utilizando um estojo existente nos circuitos comerciais. Para a síntese da segunda cadeia, faz-se

digerir a cadeia de ARN do híbrido de ARN/ADN com RNAse H e efectua-se a síntese da segunda cadeia utilizando a polimerase I do ADN de *E. coli*. Depois é possível fazer as extremidades a condizer, utilizando polimerase de ADN de T4, e tais extremidades podem ser unidas a ligadores adequados para os locais de clivagem de restrição. Após a digestão de restrição com a endonuclease de restrição adequada, isola-se o fragmento de ADNc a partir de um gel de agarose e liga-se a um vector que tenha sido previamente cortado de uma forma conveniente. O vector contendo a inserção de ADNc pode ser utilizado então para transformar células de *E. coli* competentes. As colónias resultantes são depois transferidas para membranas, destruídas por citólise e desnaturadas e finalmente são detectadas por hibridação com um ácido nucleico que tenha sido marcado com digoxigenina ou biotina. Logo que o correspondente ADNc tenha sido preparado por manipulação genética, é possível isolar os fragmentos de ADN desejados, com origem nos retrovírus. A incorporação destes fragmentos em vectores de expressão convenientes vai permitir então que tenha lugar a expressão da proteína desejada ou do fragmento proteínico desejado para subsequente utilização em ensaios de diagnóstico.

2) Como alternativa ao método enunciado, o ácido nucleico do vírus da imunodeficiência pode ser clonado recorrendo à tecnologia de PCR. Para tal, é necessário, em cada caso, identificar, a partir da região ainda desconhecida da sequência, iniciadores que façam com que seja possível, em combinação com os iniciadores obtidos a partir da parte conhecida da sequência, amplificar o ADN do isolado.

3) Uma outra possibilidade de clonagem do vírus, partindo do segmento de sequência conhecido, consiste em fazer a clonagem do ADN genómico proviral do vírus. Para tal, recorrendo a métodos convencionais, purifica-se, em

primeiro lugar, o ADN genómico proveniente de uma linhagem de células infectadas. O ADN proviral, que é integrado no genoma hospedeiro, pode ser então clonado após a construção e a pesquisa de uma biblioteca genómica. Para tal, o ADN genómico é parcialmente fragmentado e isola-se a fracção que contém os fragmentos com um comprimento de cerca de 10-25 kb e faz-se a sua clonagem num sistema vectorial, por exemplo, cosmídeos ou fagos lambda, que tenha capacidade para acomodar fragmentos com este comprimento. Utilizando o sistema vectorial seleccionado, submete-se a mistura de fragmentos genómicos a uma transformação numa estirpe de *E. coli*. Os vectores contendo o genoma viral podem ser então identificados por hibridação com um fragmento de ADN clonado do vírus pós-pesquisado, fragmento esse que é marcado radioactivamente ou de qualquer outra forma, sendo subsequentemente isolado (pesquisa de placas ou pesquisa de colónias). Deste modo, o genoma viral fica convenientemente preparado para a análise sequencial e para a expressão das suas proteínas.

A semelhança entre os diferentes isolados virais pode ser expressa pelo grau de homologia entre as sequências de ácidos nucleicos ou de proteínas. Uma homologia de 50% significa, por exemplo, que há uma correspondência mútua de 50 entre 100 posições de nucleótidos ou de aminoácidos nas sequências. A homologia das proteínas é determinada pela análise das sequências. As sequências de ADN homólogas também podem ser identificadas pela técnica de hibridação.

Assim, o objecto da presente invenção é um vírus da imunodeficiência do grupo dos VIH depositado na Colecção Europeia de Culturas de Células Animais (ECACC) com o número V 95012601 e com a designação de MVP-2901/94. A data de depósito foi 28 de Janeiro de 1995.

Para a caracterização imunológica dos vírus são determinantes os epítopos que dão origem a uma produção ampliada de anticorpos em pessoas infectadas e que são

adequados para classificar os vírus em diferentes subclasses e subtipos. Deste modo, os epítopos relevantes neste contexto são, em particular, não aqueles que também se encontram presentes nos vírus dos grupos HIV-1 e/ou HIV-2, mas sim os epítopos que ocorrem apenas nos vírus depositados, de acordo com a invenção, e nas variantes pertencentes ao grupo restrito do vírus MVP-2901/94. As propriedades morfológicas e imunológicas do vírus estão também reflectidas na região relevante, em termos de diagnóstico, da proteína de revestimento.

Os vírus da imunodeficiência de acordo com a invenção apresentam uma sequência de ARN que é complementar da sequência de ADN indicada no quadro 1 e possuem uma homologia pelo menos igual a 85% com a sequência indicada no quadro 1.

A presente invenção também diz respeito a um ADNc que é complementar do ARN do vírus da imunodeficiência MVP-2901/94 depositado na Colecção Europeia de Culturas de Células Animais (ECACC) com o número V 95012601 ou o vírus de acordo com a invenção em conformidade com a reivindicação 1.

Na variante preferencial, este ADNc está sob a forma de ADN recombinante.

A invenção também diz respeito aos antigénios que são preparados utilizando o ADNc de acordo com a invenção ou o ADN recombinante, ou utilizando a estrutura de aminoácidos que podem ser deduzidos a partir deste ADNc. Neste contexto, o antigénio é uma proteína ou um péptido.

De acordo com a invenção, o antigénio possui uma sequência de aminoácidos que corresponde à sequência de aminoácidos indicada no quadro 1.

De acordo com uma variante particularmente preferencial, o antigénio de acordo com a invenção apresenta uma sequência de aminoácidos NQQLLNLWGCKGKLICYTSVKWN.

A presente invenção também diz respeito a antigénios que são preparados a partir de um vírus de imunodeficiência

de acordo com a reivindicação 1, por exemplo, sob a forma de preparações virais purificadas. O antigénio de acordo com a invenção é preparado, preferencialmente, por meios recombinantes; no entanto, também é possível preparar o antigénio por via sintética, por exemplo, por síntese em fase sólida.

A invenção compreende também estojos de ensaio para a detecção de anticorpos contra vírus que causam imunodeficiência, os quais contêm pelo menos um antigénio de acordo com a invenção.

Os estojos de ensaio podem basear-se nas manchas de Western, nos testes ELISA ou nos ensaios de detecção de anticorpos por fluorescência. Recentemente apareceram métodos de amplificação do ácido nucleico viral, ou de uma sua região específica, que são bastante sensíveis e eficazes para diagnosticar vírus, em particular vírus do grupo dos VIH.

Um dos métodos de detecção conhecidos é a reacção em cadeia com polimerase (PCR). Em alternativa a este método, também é possível utilizar a reacção em cadeia com polimerase competitiva para detectar infecções com os VIH (por exemplo, AIDS (1983), 7, Suppl. 2; S 65-S 71).

Um outro método de detecção que adquiriu recentemente importância, em especial no que diz respeito ao diagnóstico dos VIH, é o método NASBA (amplificação com base nas sequências de ácidos nucleicos). Este método está descrito, por exemplo, em "AIDS 1993, 7 (Suppl. 2); S 107-S 110". Neste método, o ARN de cadeia singular, ou então o ADN de cadeia dupla, é amplificado com polimerase de ARN de T7 e depois é detectado.

Um outro método para a detecção de vírus do grupo dos VIH é o que consiste em fazer a detecção por meio de amplificação do sinal utilizando ADN ramificado. Este método está descrito, por exemplo, na obra "AIDS 1993, 7 (Suppl. 2); S 11-S 14". Segundo este método, o ácido

nucleico viral é hibridado com amostras de sondagem que são ligadas a uma fase sólida. Além disso, uma molécula de detecção (estruturas de ADN ramificado) é hibridada com a amostra de sondagem e depois é detectada enzimaticamente.

Uma particularidade partilhada em comum pelos métodos supramencionados assenta no facto de regiões definidas de ácidos nucleicos, que são específicas dos vírus que se pretende detectar, serem utilizadas nos métodos de detecção. No caso destes métodos de detecção, são seleccionados para a sua prática fragmentos de ácidos nucleicos curtos e definidos que são, em particular, fragmentos de ADN.

Os vírus da imunodeficiência de acordo coma invenção, o ADNc de acordo com a invenção e os antigénios podem ser utilizados para detectar retrovírus que causem imunodeficiência.

Os antigénios de acordo com a invenção podem ser utilizados, em particular, para a preparação de vacinas.

A invenção também diz respeito ao ácido ribonucleico que codifica um vírus de acordo com a invenção.

No âmbito da presente invenção, foi sequenciada uma parte da proteína de revestimento que tem particular relevância para efeitos de diagnóstico. Esta parte é uma região do invólucro que abrange a área do chamado elo V3; a região que foi sequenciada no âmbito da presente invenção prolonga-se para o interior da chamada região gp 41.

No âmbito da presente invenção foi sequenciada, em primeiro lugar, uma parte da proteína de revestimento e concluiu-se que esta sequência apresenta apenas um grau relativamente diminuto de homologia com as correspondentes sequências de vírus do tipo dos VIH. A comparação com as sequências dos VIH, que foi efectuada recorrendo a bases de dados, indicou que a região gp 41, em particular, apresentava no máximo uma homologia de 79,1% ao nível dos nucleótidos.

A sequência do vírus de acordo com a invenção difere das sequências dos vírus anteriormente conhecidos. Assim

sendo, a presente invenção diz respeito aos vírus e às correspondentes sequências de ADN e de aminoácidos que correspondam substancialmente à sequência do vírus de acordo com a invenção, sendo o grau de desvio determinado pelo grau de homologia. Por exemplo, uma homologia superior a 85% significa então que estão abrangidas as sequências em que pelo menos 85 de 100 nucleótidos ou aminoácidos sejam nucleótidos ou aminoácidos idênticos, podendo os restantes ser diferentes. Quando se está a definir a homologia, as duas sequências são alinhadas de tal maneira que o maior número possível de nucleótidos ou de aminoácidos correspondentes entre si coincidam uns com os outros.

Com base na sequência isolada é possível formular e sintetizar epítopos (péptidos) imunodominantes. Uma vez que a sequência de ácidos nucleicos do vírus é conhecida, um especialista na matéria pode deduzir a sequência de aminoácidos a partir daquela. No quadro 1 está indicada uma região constituinte da sequência de aminoácidos. Assim sendo, a presente invenção também diz respeito a antigénios, isto é proteínas, oligopeptidos ou polipeptidos que possam ser preparados utilizando a informação explicitada no quadro 1. Estes antigénios, proteínas polipeptidos ou oligopeptidos apresentam as sequências de aminoácidos indicadas no quadro 1. Os antigénios ou péptidos podem apresentar sequências constituintes relativamente curtas de uma sequência de aminoácidos que é reproduzida no quadro 1. Esta sequência de aminoácidos tem um comprimento que possui pelo menos 10 aminoácidos, de preferência pelo menos 20 e em particular possui preferencialmente pelo menos 25 aminoácidos. Por outro lado, para além de se utilizar a tecnologia recombinante, estes péptidos também podem ser preparados por métodos sintéticos. Uma via conveniente de preparação é a síntese em fase sólida do tipo Merrifield. É possível encontrar uma descrição minuciosa desta técnica e de outros métodos

conhecidos pelos especialistas na matéria em obras já publicadas, por exemplo, a obra de M. Bodansky, *et al.*, 'Peptide Synthesis', John Wiley & Sons, 2ª edição, 1976.

Nos testes de diagnóstico utiliza-se uma amostra sérica retirada da pessoa que se pretende investigar, que é colocada em contacto com as cadeias proteínicas de uma ou várias proteínas ou glicoproteínas (que podem ser expressas em linhagens de células eucarióticas), ou partes suas, provenientes do MVP-2901/94. Os métodos de ensaio considerados preferenciais compreendem os métodos de ensaio por imunofluorescência ou imunoenzimáticos (*v.g.*, o protocolo ELISA e de imunotransferência).

Nos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), o antigénio obtido a partir de MVP-2901/94, ou de uma sua variante, pode ser ligado, por exemplo, às paredes de placas de microtitulação. A dose que é utilizada neste contexto depende essencialmente do sistema de ensaio e do tratamento das placas de microtitulação. O soro ou as diluições de soro retirado da pessoa que se pretende investigar são então acrescentados às cavidades das placas de microtitulação. Decorrido um período de incubação definido, efectua-se a lavagem da placa e faz-se a detecção dos complexos imunitários específicos com anticorpos que se ligam especificamente às imunoglobulinas humanas e que tenham sido ligadas antecipadamente a uma enzima, por exemplo, peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, etc., ou a um antigénio marcado por uma enzima. Estas enzimas conseguem converter um substrato incolor num produto fortemente colorido e a presença dos anticorpos anti-VIH específicos pode ser então determinada em função da intensidade da cor. Uma outra utilização possível para os vírus de acordo com a invenção nos sistemas de ensaio é a sua aplicação na metodologia das manchas de Western.

Embora seja extremamente difícil preparar vacinas contra as doenças originadas pela imunodeficiência, este

vírus, ou partes suas, isto é, epítopos imunodominantes e indutores da imunidade celular, ou antigénios preparados por via recombinante, também podem ser utilizados, todavia, para o desenvolvimento e preparação de vacinas.

Exemplo 1 (criação dos vírus em cultura)

O vírus da imunodeficiência de acordo com a invenção, MVP-2901/94, foi isolado a partir do sangue de uma paciente que manifestava sinais de imunodeficiência. Para tal, foram utilizadas as suas células mononucleares periféricas (linfócitos periféricos do sangue, PBL) e linfócitos periféricos do sangue (PBL) de um dador que não estava infectado com os VIH, tendo sido estimulados com fito--hemaglutinina e mantidos em cultura. Para o efeito, utilizou-se o meio tradicional RPMI 1640 contendo 10% de soro de vitelo fetal. As condições de cultura são as que foram descritas por Landay A. *et al.*, J. Inf. Dis. 161 (1990) pp. 706-710. Não foi observada nenhuma formação de células gigantes. Determinou-se a produção dos vírus da IH medindo o antigénio p 24, utilizando o estojo de ensaio da 'Abbott' existente nos circuitos comerciais. Um outro ensaio que foi utilizado para a determinação do crescimento dos vírus foi aquele em que é utilizada a transcriptase inversa ligada a partículas (Eberle J., Seibl R., J. Virol. Methods 40, 1992, pp. 347-356). Em consequência, com a finalidade de se monitorizar a produção de vírus, determinou-se o crescimento dos vírus uma ou duas vezes por semana com base nas actividades enzimáticas do sobrenadante da cultura. Foram acrescentados novos linfócitos dadores uma vez por semana.

A partir do momento em que ficou estabelecida a multiplicação dos vírus da IH, foram utilizados linfócitos periféricos recentes, provenientes do sangue (PBL) de dadores saudáveis que não estavam infectados com os VIH, os quais foram infectados com o sobrenadantes da primeira

cultura. Repetiu-se este passo e depois efectuou-se a infecção de células NT2 ou de Jurkat utilizando para tal o sobrenadante. Deste modo, foi possível produzir os vírus da imunodeficiência de uma maneira permanente.

Exemplo 2

Isolamento do ADN e amplificação e caracterização estrutural dos segmentos do genoma do isolado dos VIH designado por MVP-2901/94 (que codifica a gp 41)

Isolou-se o ADN genómico proveniente de linfócitos de sangue infectados com MVP-2901/94, recorrendo a métodos convencionais (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, 1994).

Para se fazer a caracterização das regiões do genoma do isolado MVP-2901/94 foram realizadas experiências de PCR (reacção em cadeia com polimerase), utilizando pares de iniciadores obtidos a partir da região da proteína de revestimento gp 41. A PCR (Saiki *et al.*, Science 239: 487-491, 1988) foi executada com as modificações a seguir enunciadas.

Para a amplificação das regiões de ADN específicas dos VIH utilizou-se uma pipeta com a qual se fez uma aplicação de 5 µL (200 µg/mL) de ADN genómico proveniente de linfócitos do sangue infectados com MVP-2901/94 em 100 µL de uma mistura de reacção (0,25 mM dNTP), 1 µM para cada iniciador, 10 mL de tris/HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,001% de gelatina, 2,5 unidades de polimerase de Taq (Perkin Elmer), e amplificou-se de acordo com o seguinte programa de temperaturas: 1. desnaturação inicial: 3 minutos a 95°C, 2. amplificação: 90 segundos a 94°C, 60 segundos a 56°C, 90 segundos a 72°C (30 ciclos).

Os iniciadores que foram utilizados para a PCR e para a sequenciação dos nucleótidos foram sintetizados num equipamento de síntese de oligonucleótidos 'Biosearch 8750', tendo os iniciadores as sequências seguintes:

(Seq. ID No. 3-9)

5' 3'

212 AGT GCA GCA GGT AGC ACT ATG

214 TTT AGT TAT GTC AAA CCA ATT C

412 GTT CCA TTT TAC TGA TGT GTA

425 TCG GTA CGA ACC CAC TCA T

431 ACT ATA CCC CTC ATT AAT GA

438 AAC TGT CAT GGA GAA TTC TTT TA

447 AGT AGT TAC TTG TAC ACA TGG

Uma vez que não foi possível amplificar o isolado utilizando os iniciadores descritos na literatura (Lauré, F. *et al.*, Lancet ii (1988) 538-541 para *pol* 3 e *pol* 4 e Ou C. Y. *et al.*, Science 239 (1988) 295-297 para *sk* 38/39 e *sk* 68/69), procedeu-se à construção de uma grande variedade de novos iniciadores, obtidos a partir de sequências conhecidas e que foram tão fortemente conservadas quanto possível, tendo sido utilizados em todas as combinações concebíveis, ao mesmo tempo que se fazia variar as condições de reacção. Surpreendentemente, verificou-se que a combinação dos iniciadores 212 e 412, obtidos a partir da sequência do isolado MVP-5180/91, permitiu amplificar o ADN do MVP-2901/94, proporcionando assim uma primeira intrusão na sequência do isolado.

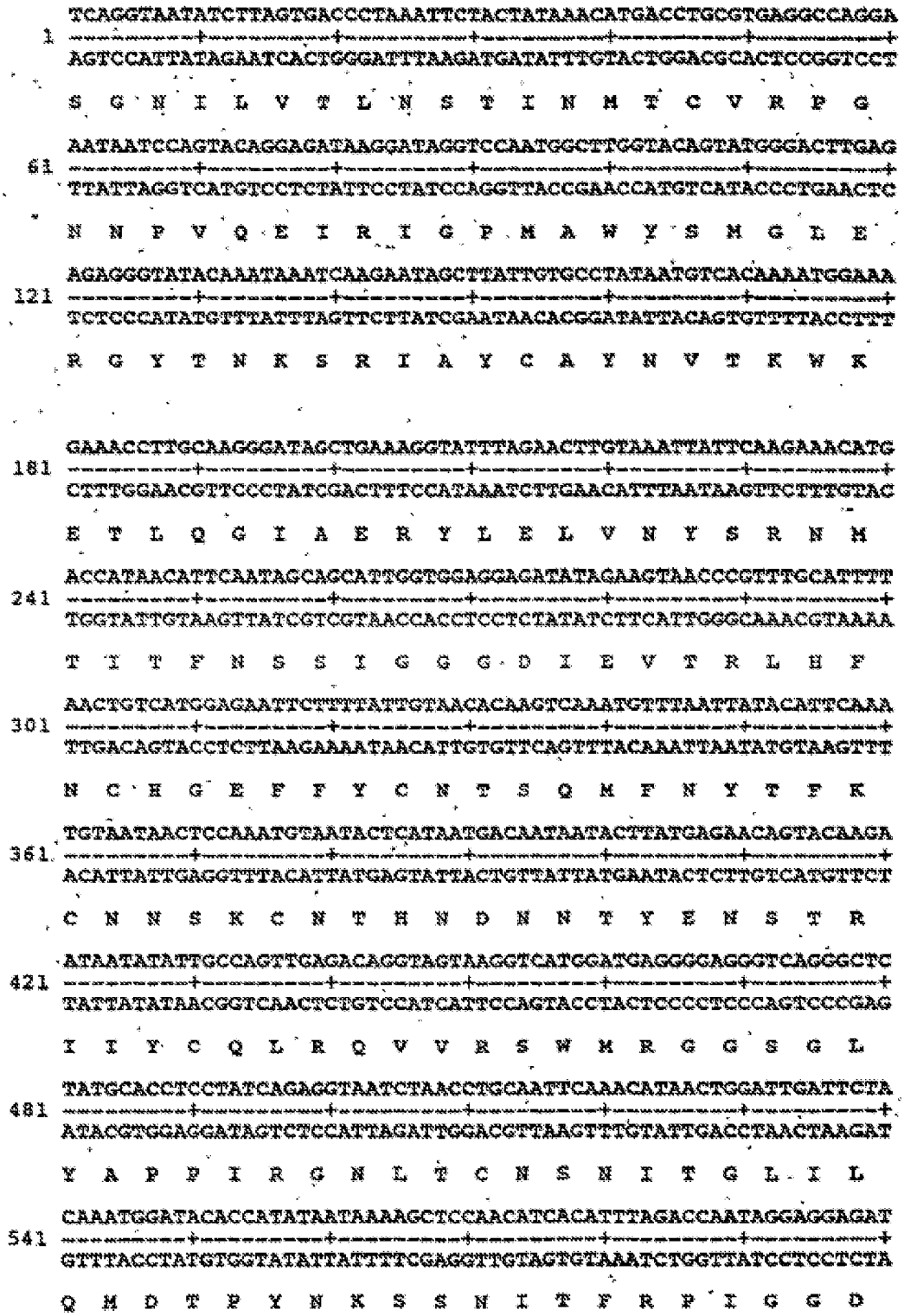
Como resultado da sequenciação da primeira amostra amplificada, foi possível engendrar os iniciadores 425 e 431 específicos do MVP-2901/94. Para se expandir ainda mais a região agora conhecida, foram engendrados novos iniciadores em conformidade com os critérios supramencionados e foram utilizados em combinação com o iniciador 425 ou com o iniciador 431. Assim, a expansão na direcção 3' foi conseguida utilizando o iniciador 214 derivado do MVP-5180/91 em combinação com o iniciador 425, e a expansão na direcção 5' foi conseguida utilizando as combinações 431/438 e 431/447, tendo os iniciadores 438 e 447 sido obtidos a partir

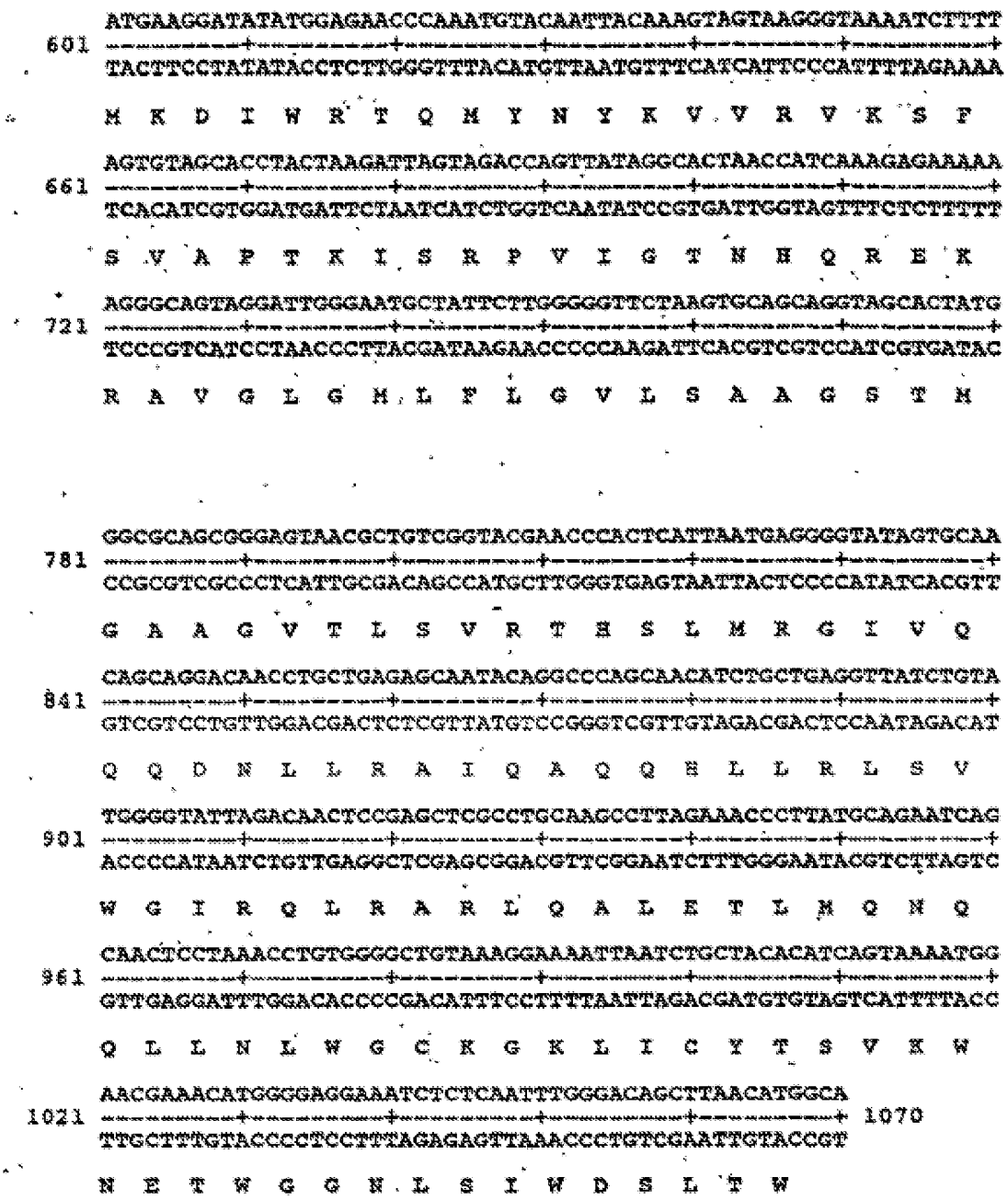
de regiões que são conservadas na maioria dos subtipos de HIV-1.

O ADN amplificado foi fraccionado utilizando gel de agarose "Nusieve" a 3% (proveniente de 'Biozyme') e o fragmento amplificado foi excisado e tratado com um volume igual de tampão (1xTBE (0,09 M tris/borato, 0,002 M EDTA, pH 8,0)). Após a incubação da mistura de ADN/agarose a 70°C durante 10 minutos e subsequente extracção com fenol, fez-se precipitar o ADN a -20°C durante 15 minutos, a partir da fase aquosa, mediante a adição de 1/10 volume de 3M NaAc, pH 5,5 e 2 volumes de etanol e depois granulou-se numa centrifugadora Eppendorf (13000 r.p.m., 10', 4°C). O ADN granulado foi submetido a uma operação de secagem e removido em água e a seguir foi sequenciado pelo método de Sanger (F. Sanger, Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5463, 1977) depois de a concentração do ADN ter sido determinada fotometricamente a 260 nm com um espectrofotómetro Beckman. Em vez de se fazer a sequenciação com a polimerase de ADN de Klenow, efectuou-se a reacção de sequenciação utilizando um estojo proveniente de 'Applied Biosystems' ("Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing", n° de catálogo: 401150). Um dos iniciadores utilizados para a PCR foi aplicado, em cada caso, (1 µM em cada caso) como iniciador em reacções de sequenciação separadas. Analisou-se a reacção de sequenciação utilizando para tal o sequenciador de ADN 373A da 'Applied Biosystems', de acordo com as instruções do fabricante.

A sequência de nucleótidos e a região do ADN amplificada, e também a sequência de aminoácidos a partir daí deduzida, estão ilustradas no quadro 1 (Seq. ID N°: 10)

Quadro 1


TCAGGTAATATCTTAGTGACCCTAAATTCTACTATAAACATGACCTGCGTGAGGCCAGGA
AGTCCATTATAGAATCACTGGGATTTAAGATGATATTTGTACTGGACGCACTCCGGTCCT
S G N I L V T L N S T I N M T C V R P G
AATAATCCAGTACAGGAGATAAGGATAGGTCCAATGGCTTGGTACAGTATGGGACTTGAG
TTATTAGGTCATGTCCTCTATTCCTATCCAGGTTACCGAACCATGTCATACCCTGAACTC
N N P V Q E I R I G P M A W Y S M G L E
AGAGGGTATACAAATAAATCAAGAATAGCTTATTGTGCCTATAATGTCACAAAATGGAAA
TCTCCCATATGTTTATTTAGTTCTTATCGAATAACACGGATATTACAGTGTTTTACCTTT
R G Y T N K S R I A Y C A Y N V T K W K
GAAACCTTGCAAGGGATAGCTGAAAGGTATTTAGAACTTGTAAATTATTCAAGAAACATG
CTTTGGAACGTTCCCTATCGACTTTCCATAAATCTTGAACATTTAATAAGTTCTTTGTAC
E T L Q G I A E R Y L E L V N Y S R N M
ACCATAACATTCAATAGCAGCATTGGTGGAGGAGATATAGAAGTAACCCGTTTGCATTTT
TGGTATTGTAAGTTATCGTCGTAACCACCTCCTCTATATCTTCATTGGGCAAACGTAAAA
T I T F N S S I G G G D I E V T R L H F
AACTGTCATGGAGAATTCTTTTATTGTAACACAAGTCAAATGTTTAATTATACATTCAAA
TTGACAGTACCTCTTAAGAAAATAACATTGTGTTCAGTTTACAAATTAATATGTAAGTTT
N C H G E F F Y C N T S Q M F N Y T F K
TGTAATAACTCCAAATGTAATACTCATAATGACAATAATACTTATGAGAACAGTACAAGA
ACATTATTGAGGTTTACATTATGAGTATTACTGTTATTATGAATACTCTTGTCATGTTCT
C N N S K C N T H N D N N T Y E N S T R
ATAATATATTGCCAGTTGAGACAGGTAGTAAGGTCATGGATGAGGGGAGGGTCAGGGCTC
TATTATATAACGGTCAACTCTGTCCATCATTCCAGTACCTACTCCCCTCCCAGTCCCGAG
I I Y C Q L R Q V V R S W M R G G S G L
TATGCACCTCCTATCAGAGGTAATCTAACCTGCAATTCAAACATAACTGGATTGATTCTA
ATACGTGGAGGATAGTCTCCATTAGATTGGACGTTAAGTTTGTATTGACCTAACTAAGAT
Y A P P I R G N L T C N S N I T G L I L
CAAATGGATACACCATATAATAAAAGCTCCAACATCACATTTAGACCAATAGGAGGAGAT
GTTTACCTATGTGGTATATTATTTTCGAGGTTGTAGTGTAAATCTGGTTATCCTCCTCTA
Q M D T P Y N K S S N I T F R P I G G D



Exemplo 3

Como distinguir o isolado MVP-2901/94 de outros isolados do VIH

A sequência de nucleótidos encontrada, representada no quadro 1, foi examinada para pesquisa de sequências homólogas na base de dados 'GENEBANK' (autorização 83,

Junho de 1994) e na base de dados 'EMBL' (autorização 38, Março de 1994), ao passo que a sequência proteínica deduzida a partir daí foi examinada com recurso à base de dados de proteínas 'SWISSPROT' (autorização 28, Fevereiro de 1994), utilizando o programa informático GCG (Genetic Computer Group, Inc. Wisconsin USA, versão 7.1, Março de 1992). A maior parte das sequências nucleotídicas que eram conhecidas em Julho de 1994 para vírus de imunodeficiência de origem humana e para isolados de primatas estavam contidas nas referidas bases de dados.

No melhor caso, a sequência de nucleótidos do quadro 1 apresenta uma homologia de 79,6% com um isolado de subtipo O do HIV-1. A melhor homologia com um outro subtipo de HIV-1 é de 59,6%. Na melhor situação, o ADN do quadro 1 apresenta uma homologia de 51,6% com isolados de HIV-2.

Na melhor situação, a sequência de aminoácidos do quadro 1 apresenta uma homologia de 72,7% com o correspondente segmento da proteína de revestimento de um representante de subtipo O do HIV-1 e no melhor dos casos apresenta uma homologia de 52,1% com o isolado HIV-1-Mal do HIV-1. A sequência de aminoácidos no quadro 1 apresenta, na melhor situação, uma homologia de 37,0% com as proteínas de revestimento do HIV-2 (isolado HIV-2 ROD).

Quadro 2. Comparação da homologia entre o MVP-2901/94 e outros isolados de VIH ao nível dos nucleótidos e das proteínas

	Melhores homologias com representantes do subtipo O do HIV1	Melhor homologia com um outro subtipo HIV1	Melhor homologia com um isolado de HIV2
Ao nível dos nucleótidos	79,1% ANT70 78,0% MVP-5180	59,6% HIV1u08450 (subtipo B)	51,6% HIV2U1GMN
Ao nível das proteínas	72,7% ANT70 70,3% MVP-5180	52,1% HIV1MAL (subtipo B)	37,0% HIV2ROD

Com base nas comparações de homologia, o isolado de MVP-2901/94 é mais semelhante aos dois isolados de 5180/91 que haviam previamente sido designados por subtipo O do HIV-1. Contudo, existe uma heterologia sequencial relativamente elevada, pelo menos igual a 20,9% ao nível dos nucleótidos e pelo menos igual a 27,3% ao nível das proteínas, no que respeita aos dois isolados.

A região ENV é, termos de diagnóstico, a região relevante da proteína de revestimento, estando essa região indicada no quadro 1 tanto pela sequência de nucleótidos como pela sequência de aminoácidos.

Exemplo 4 (Dados serológicos respeitantes ao MVP-2901/94)

Para se avaliar a importância do vírus para efeitos de serodiagnóstico, examinou-se uma amostra de soro retirada da paciente infectada com o 2901, utilizando para tal diversos ensaios de despistagem anti-HIV-1/2 existentes nos circuitos comerciais.

No Quadro 3 estão agrupados resultados das investigações efectuadas.

Quadro 3

Amostra de sondagem	Enzygnost anti-HIV 1/-HIV 2	Abbott anti--HIV-1/2, 3ª geração	Ortho/CBC Anti-HIV 1/2	Péptido 2901 gp41
2901	0,7	0,5	0,4	4,2

Valores do índice D.O./Valor Crítico

É evidente, a partir do Quadro 3, que nenhum dos estojos de ensaio existentes nos circuitos comerciais permite detector esta amostra. Pelo contrário, no caso de se recorrer a um novo protocolo 'ELISA' em que é utilizado um péptido (NQQRLNLWQGCKGKLICYTSKWN) que corresponde, com excepção de um aminoácido (NQQRL em vez de NQQLL), à sequência 2901, enquanto antigénio de fase sólida, e utiliza os reagentes 'Enzygnost anti-HIV-1/2', enquanto reagentes em fase líquida, a amostra é então detectada com fiabilidade. Os testes pelas manchas de Western, existentes nos circuitos comerciais, por exemplo, os obtidos no Instituto Pasteur, não permitem detectar esta amostra de MVP-2901/94 (não ilustrado). Assim sendo, tais testes das manchas de Western irão originar, muito provavelmente, um resultado falso negativo com as amostras provenientes de um indivíduo infectado com MVP2901/94.

Uma região particularmente preferida da sequência de aminoácidos ilustrada no Quadro 1 é a região que começa com a sequência de aminoácidos NQQLL… (esta região começa, grosso modo, no nucleótido 1010 de acordo com a numeração utilizada no Quadro 1).

O exemplo 4 demonstra também que é possível fazer alterações menores, para se tirar proveito desta memória descritiva em termos de diagnóstico, na sequência de

aminoácidos sem que daí resulte um efeito prejudicial sobre a relevância de um teste correspondente para o diagnóstico.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

REQUERENTE:

(A) NOME: Behringwerke Aktiengesellschaft

(B) RUA: Postfach 11 40

(C) CIDADE: Marburg

(E) PAÍS: Alemanha

(F) CÓDIGO POSTAL: 35001

TÍTULO DA INVENÇÃO:

Retrovírus do grupo dos VIH e sua aplicação (MVP-2901/94)

NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 12

FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

(A) SUPORTE: disquete

(B) COMPUTADOR: compatível com IBM PC

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PADAT Sequenzmodul Versão 1.0

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

AGTGCAGCAG GTAGCACTAT G 21

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:
GTTCCATTTT ACTGATGTGT A 21

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:3:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:
AGTGCAGCAG GTAGCACTAT G 21

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:4:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 22 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:
TTTAGTTATG TCAAACCAAT TC 22

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:5:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

GTTCCATTTT ACTGATGTGT A 21

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:6:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 19 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

TCGGTACGAA CCCACTCAT 19

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:7:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

ACTATACCCC TCATTAATGA 20

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:8:
(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:

AACTGTCATG GAGAATTCTT TTA 23

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:

AGTAGTTACT TGTACACATG G 21

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 1070 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10:

TCAGGTAATA TCTTAGTGAC CCTAAATTCT ACTATAAACA TGACCTGCGT
GAGGCCAGGA 60

AATAATCCAG TACAGGAGAT AAGGATAGGT CCAATGGCTT GGTACAGTAT
GGGACTTGAG 120

AGAGGGTATA CAAATAAATC AAGAATAGCT TATTGTGCCT ATAATGTCAC
AAAATGGAAA 180

GAAACCTTGC AAGGGATAGC TGAAAGGTAT TTAGAACTTG TAAATTATTC
AAGAAACATG 240

ACCATAACAT TCAATAGCAG CATTGGTGGA GGAGATATAG AAGTAACCCG
TTTGCATTTT 300

AACTGTCATG GAGAATTCTT TTATTGTAAC ACAAGTCAAA TGTTTAATTA
TACATTCAAA 360

TGTAATAACT CCAAATGTAA TACTCATAAT GACAATAATA CTTATGAGAA
CAGTACAAGA 420

ATAATATATT GCCAGTTGAG ACAGGTAGTA AGGTCATGGA TGAGGGGAGG
GTCAGGGCTC 480

TATGCACCTC CTATCAGAGG TAATCTAACC TGCAATTCAA ACATAACTGG
ATTGATTCTA 540

CAAATGGATA CACCATATAA TAAAAGCTCC AACATCACAT TTAGACCAAT
AGGAGGAGAT 600

ATGAAGGATA TATGGAGAAC CCAAATGTAC AATTACAAAG TAGTAAGGGT
AAAATCTTTT 660

AGTGTAGCAC CTACTAAGAT TAGTAGACCA GTTATAGGCA CTAACCATCA
AAGAGAAAAA 720

AGGGCAGTAG GATTGGGAAT GCTATTCTTG GGGGTTCTAA GTGCAGCAGG
TAGCACTATG 780

GGCGCAGCGG GAGTAACGCT GTCGGTACGA ACCCACTCAT TAATGAGGGG
TATAGTGCAA 840

CAGCAGGACA ACCTGCTGAG AGCAATACAG GCCCAGCAAC ATCTGCTGAG
GTTATCTGTA 900

TGGGGTATTA GACAACTCCG AGCTCGCCTG CAAGCCTTAG AAACCCTTAT
GCAGAATCAG 960

CAACTCCTAA ACCTGTGGGG CTGTAAAGGA AAATTAATCT GCTACACATC
AGTAAAATGG 1020

AACGAAACAT GGGGAGGAAA TCTCTCAATT TGGGACAGCT TAACATGGCA
1070

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 1070 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:11:

AGTCCATTAT AGAATCACTG GGATTTAAGA TGATATTTGT ACTGGACGCA CTCCGGTCCT 60

TTATTAGGTC ATGTCCTCTA TTCCTATCCA GGTTACCGAA CCATGTCATA CCCTGAACTC 120

TCTCCCATAT GTTTATTTAG TTCTTATCGA ATAACACGGA TATTACAGTG TTTTACCTTT 180

CTTTGGAACG TTCCCTATCG ACTTTCCATA AATCTTGAAC ATTTAATAAG TTCTTTGTAC 240

TGGTATTGTA AGTTATCGTC GTAACCACCT CCTCTATATC TTCATTGGGC AAACGTAAAA 300

TTGACAGTAC CTCTTAAGAA AATAACATTG TGTTCAGTTT ACAAATTAAT ATGTAAGTTT 360

ACATTATTGA GGTTTACATT ATGAGTATTA CTGTTATTAT GAATACTCTT GTCATGTTCT 420

TATTATATAA CGGTCAACTC TGTCCATCAT TCCAGTACCT ACTCCCCTCC CAGTCCCGAG 480

ATACGTGGAG GATAGTCTCC ATTAGATTGG ACGTTAAGTT TGTATTGACC TAACTAAGAT 540

GTTTACCTAT GTGGTATATT ATTTTCGAGG TTGTAGTGTA AATCTGGTTA TCCTCCTCTA 600

TACTTCCTAT ATACCTCTTG GGTTTACATG TTAATGTTTC ATCATTCCCA TTTTAGAAAA 660

TCACATCGTG GATGATTCTA ATCATCTGGT CAATATCCGT GATTGGTAGT TTCTCTTTTT 720

TCCCGTCATC CTAACCCTTA CGATAAGAAC CCCCAAGATT CACGTCGTCC ATCGTGATAC 780

CCGCGTCGCC CTCATTGCGA CAGCCATGCT TGGGTGAGTA ATTACTCCCC ATATCACGTT 840

GTCGTCCTGT TGGACGACTC TCGTTATGTC CGGGTCGTTG TAGACGACTC CAATAGACAT 900

ACCCCATAAT CTGTTGAGGC TCGAGCGGAC GTTCGGAATC TTTGGGAATA CGTCTTAGTC 960

GTTGAGGATT TGGACACCCC GACATTTCCT TTTAATTAGA CGATGTGTAG TCATTTTACC 1020

TTGCTTTGTA CCCCTCCTTT AGAGAGTTAA ACCCTGTCGA ATTGTACCGT 1070

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 356 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CORDÃO: desconhecido

(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:12:

Ser Gly Asn Ile Leu Val Thr Leu Asn Ser Thr Ile Asn Met Thr Cys
1 5 10 15

Val Arg Pro Gly Asn Asn Pro Val Gln Glu Ile Arg Ile Gly Pro Met
20 25 30

Ala Trp Tyr Ser Met Gly Leu Glu Arg Gly Tyr Thr Asn Lys Ser Arg
35 40 45

Ile Ala Tyr Cys Ala Tyr Asn Val Thr Lys Trp Lys Glu Thr Leu Gln
50 55 60

Gly Ile Ala Glu Arg Tyr Leu Glu Leu Val Asn Tyr Ser Arg Asn Met
65 70 75 80

Thr Ile Thr Phe Asn Ser Ser Ile Gly Gly Gly Asp Ile Glu Val Thr
85 90 95

Arg Leu His Phe
100

Asn Cys His Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Gln Met Phe Asn
105 110 115

Tyr Thr Phe Lys Cys Asn Asn Ser Lys Cys Asn Thr His Asn Asp Asn
120 125 130

Asn Thr Tyr Glu Asn Ser Thr Arg Ile Ile Tyr Cys Gln Leu Arg Gln
135 140 145

Val Val Arg Ser Trp Met Arg Gly Gly Ser Gly Leu Tyr Ala Pro Pro
150 155 160

Ile Arg Gly Asn Leu Thr Cys Asn Ser Asn Ile Thr Gly Leu Ile Leu
165 170 175
180

Gln Met Asp Thr Pro Tyr Asn Lys Ser Ser Asn Ile Thr Phe Arg Pro
185 190
195

Ile Gly Gly Asp Met Lys Asp Ile Trp Arg Thr Gln Met Tyr Asn Tyr
200 205 210

Lys Val Val Arg Val Lys Ser Phe Ser Val Ala Pro Thr Lys Ile Ser
215 220 225

Arg Pro Val Ile Gly Thr Asn His Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly
230 235 240

Leu Gly Met Leu Phe Leu Gly Val Leu Ser Ala Ala Gly Ser Thr Met
245 250 255
260

Gly Ala Ala Gly Val Thr Leu Ser Val Arg Thr His Ser Leu Met Arg
265 270
275

Gly Ile Val Gln Gln Gln Asp Asn Leu Leu Arg Ala Ile Gln Ala Gln
280 285 290

Gln His Leu Leu Arg Leu Ser Val Trp Gly Ile Arg Gln Leu Arg Ala
295 300 305

Arg Leu Gln Ala Leu Glu Thr Leu Met Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn
310 315 320

Leu Trp Gly Cys Lys Gly Lys Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp

325 330 335
340

Asn Glu Thr Trp Gly Gly Asn Leu Ser Ile Trp Asp Ser Leu
Thr Trp
345 350
355

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o EPO não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- WO 8602383 A **[0003]**
- EP 0239425 A **[0004]**

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- **BARRÉ-SINOUSSI, F. *et al.*** *Science,* 1983, vol. 220, 868-871 **[0003]**
- **CLAVEL, F. *et al.*** *Science,* 1986, vol. 233, 343-346 **[0004]**
- *J. Vir.,* 1994, vol. 68 (3), 1586-1596 **[0005]**
- *J. Vir.,* 1994, vol. 68 (3), 1581-1585 **[0005] [0017]**
- **BENN, S. *et al.*** *Science,* 1985, vol. 230, 949-951 **[0006]**
- **CLAVEL, F. *et al.*** *Nature,* 1986, vol. 324, 691-695 **[0006] [0007]**
- **SHARP *et al.*** Origins and diversity of human immunodeficiency viruses. *AIDS,* 1994, vol. 8 (1), págs. 27-42 **[0010]**
- Viral Quantitation in HIV Infection. John Libbey Eurotext, 1991 **[0013]**
- **LAURÉ, F. *et al.*** *Lancet ii,* 1988, 538-541 **[0016] [0051]**
- **OU C.Y. *et al.*** *Science,* 1988, vol. 239, 295-297 **[0016] [0051]**
- *AIDS,* 1993, vol. 7 (2), págs. 65-71 **[0031]**
- *AIDS,* 1993, vol.7 (2), págs. 107-110 **[0032]**
- *AIDS,* 1993, vol. 7 (2), págs. 11-14 **[0033]**

• **M. BODANSKY *et al.*** Peptide Synthesis. John Weeley & Sons, 1976 **[0041]**

• **LANDAY A. *et al.*** *J. Inf. Dis.,* 1990, vol. 161, 706-710 **[0045]**

• **EBERLE J.; SEIBL R.** *J. Virol. Methods,* 1992, vol. 40, 347-356 **[0045]**

• Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, 1994 **[0047]**

• **SAIKI *et al.*** *Science,* 1988, vol. 239, 487-491 **[0048]**

• **F. SANGER.** *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 1977, vol. 74, 5463 **[0053]**

Lisboa, 26/12/2008

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus da imunodeficiência do grupo dos VIH que está depositado na Colecção Europeia de Culturas de Células Animais (ECACC) com o nº V 95012601, que recebeu a designação MVP-2901/94 e que apresenta uma sequência de ARN que é complementar da sequência de ADN ilustrada no Quadro 1 e que possui uma homologia pelo menos igual a 85% com a sequência do Quadro 1.

2. ADNc que compreende uma sequência de ácidos nucleicos identificada pela SEQ ID NO: 10 ou o seu complemento.

3. ADN recombinante que compreende o ADNc de acordo com a reivindicação 2.

4. Antigénio que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12.

5. Estojo de ensaio para detectar anticorpos contra vírus causadores de imunodeficiência, o qual contém um antigénio de acordo com a reivindicação 4.

6. Estojo de ensaio de acordo com a reivindicação 5, o qual utiliza o método Western Blot.

7. Estojo de ensaio de acordo com a reivindicação 5, o qual é um teste 'ELISA' ou um teste de detecção de anticorpos por fluorescência.

8. Utilização de um vírus da imunodeficiência de acordo com a reivindicação 1, ou de um ADNc de acordo com a reivindicação 2 e/ou de um antigénio de acordo com a reivindicação 4, para detectar retrovírus causadores de imunodeficiência.

9. Utilização de um retrovírus de acordo com a reivindicação 1, de um ADNc de acordo com a reivindicação 2 e/ou de um antigénio de acordo com a reivindicação 4, para a preparação de vacinas.

10. Ácido ribonucleico que codifica um vírus da imunodeficiência de acordo com a reivindicação 1 e que compreende uma sequência de ARN que é complementar da sequência de ADN ilustrada no Quadro 1 e que possui uma homologia pelo menos 85% igual à sequência ilustrada no Quadro 1.

Lisboa, 26/12/2008

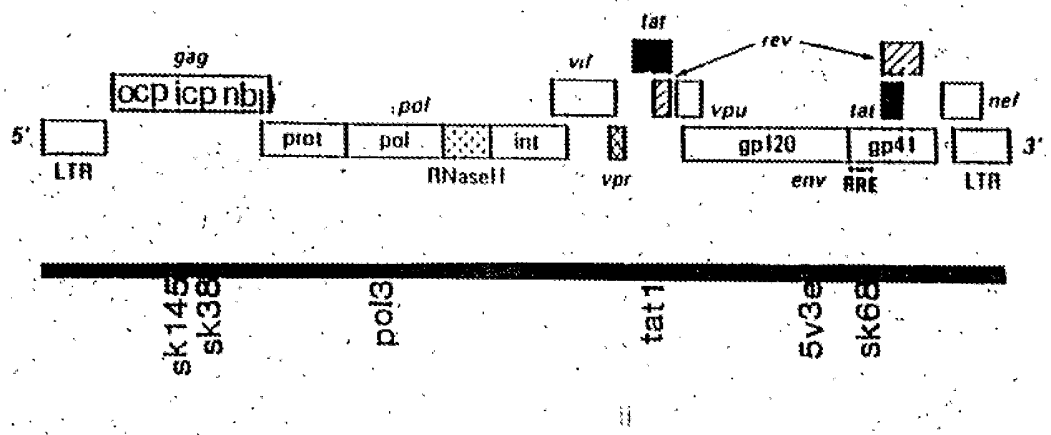

gag
ocp icp nbj
pol
prot
pol
int
RNaseH
vif
vpr
tat
rev
vpu
tat
nef
gp120
gp41
env
RRE
5'
LTR
3'
LTR
sk145
sk38
pol3
tat1
5v3e
sk68

FIG.1