

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1997.04.21	(73) Titular(es): INNOGENETICS N.V.	
(30) Prioridade(s): 1996.04.19 EP 96870053	INDUSTRIEPARK ZWIJNAARDE 7, BOX 4 9052	
(43) Data de publicação do pedido: 1999.05.12	GHENT	BE
(45) Data e BPI da concessão: 2010.11.03 016/2011	(72) Inventor(es): RUDI ROSSAU GEERT MAERTENS LIEVEN STUYVER	BE BE BE
	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA TIPIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE HBV**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA DETECÇÃO E/OU ANÁLISE GENÉTICA DE HBV NUMA AMOSTRA BIOLÓGICA, COMPREENDENDO A HIBRIDAÇÃO DOS ÁCIDOS POLINUCLEÍCOS DA AMOSTRA COM UMA COMBINAÇÃO DE PELO MENOS DUAS SONDAS NUCLEOTÍDICAS, HIBRIDANDO A REFERIDA COMBINAÇÃO ESPECIFICAMENTE COM UMA SEQUÊNCIA ALVO MUTANTE ESCOLHIDA A PARTIR DA REGIÃO GÉNICA DE RT-POL DE HBV E/OU COM UMA SEQUÊNCIA ALVO MUTANTE ESCOLHIDA A PARTIR DA REGIÃO PRECORE DE HBV E/OU COM UMA SEQUÊNCIA ALVO MUTANTE ESCOLHIDA A PARTIR DA REGIÃO HBSAG DE HBV E/OU COM UMA SEQUÊNCIA ALVO ESPECÍFICA DO GENÓTIPO DE HBV, SENDO AS REFERIDAS SEQUÊNCIAS ALVO ESCOLHIDAS A PARTIR DA FIGURA 1, E SENDO AS REFERIDAS SONDAS APLICADAS A LOCALIZAÇÕES CONHECIDAS NUM SUORTE SÓLIDO E SENDO AS REFERIDA SONDAS CAPAZES DE HIBRIDAR COM OS ÁCIDOS POLINUCLEÍCOS DA AMOSTRA SOB AS MESMAS CONDIÇÕES DE HIBRIDAÇÃO E LAVAGEM, OU HIBRIDANDO AS REFERIDAS SONDAS ESPECIFICAMENTE COM UMA SEQUÊNCIA COMPLEMENTAR A QUALQUER UMA DAS REFERIDAS SEQUÊNCIAS ALVO, OU UMA SEQUÊNCIA EM QUE T DA REFERIDA SEQUÊNCIA É SUBSTITUÍDA POR U; E DETECÇÃO DOS HÍBRIDOS FORMADOS; E INFERÊNCIA DO GENÓTIPO DE HBV E/OU DOS MUTANTES PRESENTES NA REFERIDA AMOSTRA A PARTIR DO SINAL OU SINAIS DE HIBRIDAÇÃO DIFERENCIAL OBTIDOS. A INVENÇÃO REFERE-SE AINDA A CONJUNTOS DE SONDAS NUCLEOTÍDICAS E POSSIVELMENTE INICIADORES ÚTEIS NOS REFERIDOS MÉTODOS BEM COMO À SUA UTILIZAÇÃO NUM MÉTODO PARA TIPIFICAÇÃO E/OU DETECÇÃO DE HBV E A ESTOJOS DE ENSAIO UTILIZANDO OS MESMOS.

RESUMO

"MÉTODO PARA TIPIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE HBV"

A presente invenção refere-se a um método para detecção e/ou análise genética de HBV numa amostra biológica, compreendendo a hibridação dos ácidos polinucleicos da amostra com uma combinação de pelo menos duas sondas nucleotídicas, hibridando a referida combinação especificamente com uma sequência alvo mutante escolhida a partir da região génica de RT-pol de HBV e/ou com uma sequência alvo mutante escolhida a partir da região preCore de HBV e/ou com uma sequência alvo mutante escolhida a partir da região HBsAg de HBV e/ou com uma sequência alvo específica do genótipo de HBV, sendo as referidas sequências alvo escolhidas a partir da Figura 1, e sendo as referidas sondas aplicadas a localizações conhecidas num suporte sólido e sendo as referida sondas capazes de hibridar com os ácidos polinucleicos da amostra sob as mesmas condições de hibridação e lavagem, ou hibridando as referidas sondas especificamente com uma sequência complementar a qualquer uma das referidas sequências alvo, ou uma sequência em que T da referida sequência é substituída por U; e detecção dos híbridos formados; e inferência do genótipo de HBV e/ou dos mutantes presentes na referida amostra a partir do sinal ou sinais de hibridação diferencial obtidos. A invenção refere-se ainda a conjuntos de sondas nucleotídicas e possivelmente iniciadores úteis nos referidos métodos bem como à sua utilização num método para tipificação e/ou detecção de HBV e a estojos de ensaio utilizando os mesmos.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO PARA TIPIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE HBV"

A presente invenção refere-se ao campo do diagnóstico do vírus da Hepatite B (HBV). Mais particularmente, a presente invenção refere-se ao campo da genotipagem de HBV e à determinação da presença de mutantes de HBV em amostras de teste.

A presente invenção refere-se particularmente a um método para a detecção rápida e fiável de mutantes e genótipos de HBV que ocorram numa amostra de teste utilizando conjuntos específicos de sondas optimizadas para funcionarem juntas num ensaio de hibridação reversa.

O vírus da hepatite B é um pequeno vírus de ADN envelopado de aproximadamente 3200 pb de comprimento. Historicamente tem sido caracterizado com base na reacção imunológica do HBsAg com conjuntos de anticorpos monoclonais. Foram descritos isolados como *a*, indicando o determinante comum para todos os diferentes subtipos, seguido de combinações específicas dos subtipos: *dw*, *dr*, *yw*, ou *yr*. Os últimos são pares de determinantes mutuamente exclusivos, cobrindo os aminoácidos de HBsAg 122 (*d*=lys, *y*=arg) e 160 (*w*=lys, *r*=arg). Existem vários subdeterminantes para *w* e podem ser atribuídos ao aparecimento de certas variantes de aminoácidos no codão 127. Mais recentemente, foi proposta uma classificação genética, baseada na análise molecular do vírus. Este tipo de análise mostrou que no total existem seis genótipos diferentes, indicados de A a F, com uma divergência genética máxima de 8% quando se comparam genomas completos (revisto por Magnius e Norder, 1995).

A variabilidade genética de HBV pode ser clinicamente importante. De facto, a variabilidade do genoma pode incluir alguns mecanismos através dos quais o HBV evita a eliminação imunitária, e induz assim infecção crónica. Um marcador proteico importante na indução de tolerância imunitária, eliminação viral e infecção crónica, é HBeAg. A expressão desta proteína é estritamente controlada tanto ao nível da transcrição como da tradução (Li *et al.*, 1993; Okamoto *et al.*, 1990; Yuan *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1995). Portanto, no curso natural da infecção por HBV, um estágio bem caracterizado da doença é indicado como hepatite B crónica negativa para HBe (revisto por Hadziyannis S.J., 1995). Esta fase é principalmente devida ao surgimento de mutações no codão de terminação da tradução preCore. A variabilidade genética global determina a frequência e localização física no genoma viral em que estas mutações do codão de terminação da tradução ocorrem. Foi proposto que a regulação da transcrição seria o mecanismo para o genótipo A (e possivelmente também o F), enquanto que o controlo da tradução seria mais provavelmente verificado nos outros genótipos (Li *et al.*; 1993; Sato *et al.*, 1995). Contrariamente à regulação da tradução, verificou-se que a regulação da transcrição era incapaz de bloquear completamente a expressão de HBeAg e portanto foi proposto categorizar o fenótipo deste mutante como suprimido em HBe, em vez de negativo para HBe (Takahashi *et al.*, 1995). Em qualquer caso, estes mutantes de preCore conduziram a uma destruição do equilíbrio preexistente entre o HBeAg em circulação e os péptidos derivados de HBc apresentados por moléculas de HLA de classe I à superfície de hepatócitos infectados, diminuindo deste modo o efeito supressor de HBeAg em células T, resultando finalmente na libertação parcial de CTLs específicos de core e conduzindo a apoptose dos hepatócitos

infectados. Em geral, após a emergência das variante HBe-menos, o curso da infecção viral caracteriza-se pela progressão da hepatite crónica, que pode conduzir ao desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (Hadziyannis, 1995).

Outro assunto para o qual a variabilidade genética ou a genotipagem do vírus pode ser relevante é o desenvolvimento de vacinas em que a resposta pode ser mediada pelo tipo de vírus. A protecção contra infecção por HBV de todos os subtipos é conferida por anticorpos para o determinante comum "a" do antigénio de superfície HB (HBsAg). Mostrou-se que este determinante "a" apresenta vários epitopos, e que a sua estrutura terciária é muito importante para a sua antigenicidade. A região mais importante reside entre o aminoácido 124 e 147, mas pode ser estendida do aminoácido 114 ao 150. Uma resposta anti-HBs adequada, montada após vacinação, é em princípio completamente protectora. A infecção com uma estirpe de HBV ancorando mutações na região determinante "a" pode resultar em insucesso da vacina, porque a resposta imunitária humoral induzida pela vacina não reconhece o HBsAg mutante. Os mutantes de escape associados à vacina mais comuns são as substituições de uma glicina na posição 145 para uma arginina (G145R), K141E e T126N. Mas foi também verificada uma inserção de 2 aa entre a posição de aa 122 e 123, e uma inserção de 8 aa entre o aa 123 e 124 (Carman *et al.*, 1990, 1995; Crawford, 1990; Waters *et al.*, 1992).

A lamivudina é um (-)-enantiómero de 3'-tiacitidina, um análogo do 2'3'-didesoxinucleósido, e sabe-se ser um potente inibidor da replicação de HBV através da inibição da actividade de transcriptase reversa (RT) da polimerase de HBV. O tratamento com lamivudina pode resultar em

melhorias histológicas em pacientes de hepatite crónica, e quando dado antes ou após transplantação de fígado, pode prevenir a re-infecção do enxerto (Honkoop *et al.*, 1995; Naoumov *et al.*, 1995). No entanto, após tratamento, pode ser observado um reaparecimento da hepatite na maioria dos pacientes, com elevações de ALT e o ADN de HBV que se torna novamente detectável. Este ressalto do ADN de HBV está associado a um novo quase equilíbrio de espécies. Nalguns casos, foi observada a superação do vírus durante a terapia, devido à selecção de estirpes de HBV resistentes à lamivudina. A natureza exacta desta superação foi atribuída à acumulação de mutações na parte RT da Polimerase. Foi verificado um mecanismo semelhante na RT-polimerase de HIV, onde após tratamento com lamivudina, se acumulavam mutações no motivo YMDD (Gao *et al.*, 1993). Este motivo YMDD está também presente na parte RT da polimerase de HBV, e as mutações seleccionadas por lamivudina em HBV foram verificadas nesta região (Tippl *et al.*, 1996), bem como noutras regiões da parte RT da polimerase (Ling *et al.*, 1996). Penciclovir é outro fármaco que se mostrou inibir a actividade de transcriptase reversa da polimerase de HBV (Shaw *et al.*, 1996), e mutações na polimerase de HBV podem também ser detectadas após tratamento com este fármaco.

Um método para a detecção de HBV numa amostra num ensaio de hibridação em sanduíche de fase em solução foi descrito no pedido de patente internacional WO 93/13120. No pedido de patente internacional WO 95/02690 é proporcionada uma composição de sondas de HBV e a determinação deste presente na amostra de teste. Na patente EP 229701 foi descrito um processo geral de PCR para detecção da presença ou ausência de um ácido nucleico num vírus.

De tudo isto pode concluir-se que a informação sobre os seguintes assuntos é essencial para um correcto diagnóstico *in vitro*, monitorização e seguimento de infecções por HBV:

- genótipo;
- mutações em preCore;
- mutações de escape à vacina;
- mutações no gene de RT seleccionadas através de tratamento com fármacos tais como lamivudina e penciclovir.

Para obter toda esta informação utilizando as tecnologias existentes é complicado, demorado e requer pessoal altamente qualificado e experimentado.

É assim um objectivo da presente invenção desenvolver um método rápido e fiável de detecção para a determinação da presença ou ausência de um ou mais genótipos de HBV possivelmente presentes numa amostra biológica.

Mais particularmente, é um objectivo da presente invenção desenvolver um método rápido e fiável de detecção para a determinação da presença ou ausência de uma ou mais variações na região de HBsAg representando um ou mais genótipos de HBV possivelmente presentes numa amostra biológica numa única experiência.

Mais particularmente, é um objectivo da presente invenção desenvolver um método rápido e fiável de detecção para a determinação da presença ou ausência de um ou mais mutantes de HBV possivelmente presentes numa amostra biológica numa única experiência.

Mais particularmente, é um objectivo da presente invenção desenvolver um método rápido e fiável de detecção para a determinação de uma ou mais mutações na região de HBsAg de

HBV possivelmente presentes numa amostra biológica numa única experiência.

Mais particularmente, é um objectivo da presente invenção desenvolver um método rápido e fiável de detecção para a determinação de uma ou mais mutações na região do gene da polimerase (pol) de HBV possivelmente presentes numa amostra biológica numa única experiência.

Mais particularmente, é um objectivo da presente invenção desenvolver um método rápido e fiável de detecção para a determinação simultânea de um ou vários genótipos de HBV em combinação com um ou vários mutantes de HBV possivelmente presentes numa amostra biológica numa única experiência.

É também um objectivo da presente invenção proporcionar um ensaio ou método de genotipagem que permita inferir a sequência nucleotídica nos codões de interesse e os mutantes de HBV de interesse, e inferir o genótipo de HBV possivelmente presente numa amostra biológica.

É o objectivo da presente invenção proporcionar um ensaio de genotipagem permitindo a detecção dos diferentes mutantes e genótipos de HBV num único dispositivo experimental.

É outro objectivo da presente invenção seleccionar determinadas sondas capazes de discriminar uma ou mais mutações de HBV numa das regiões acima mencionadas do genoma de HBV e discriminar um ou mais genótipos de HBV.

É mais particularmente um objectivo da presente invenção seleccionar determinadas sondas capazes de discriminar as sequências de HBV de tipo selvagem das de HBV mutantes.

É também um objectivo da presente invenção seleccionar determinadas sondas capazes de discriminar variantes de tipo selvagem e polimórficas de HBV de sequências mutantes de HBV.

É também um objectivo da presente invenção seleccionar determinadas sondas capazes de discriminar sequências de genótipo de HBV.

É além disso um objectivo da presente invenção combinar um conjunto de sondas seleccionadas capazes de genotipar HBV e discriminar diferentes mutantes de HBV possivelmente presentes numa amostra biológica, pelo que todas as sondas podem ser utilizadas sob as mesmas condições de hibridação e lavagem.

É também um objectivo da presente invenção seleccionar iniciadores permitindo a amplificação do fragmento ou fragmentos génicos determinando as mutações ou variações genómicas de HBV de interesse tal como discutido acima.

A presente invenção tem também por objectivo estojos de diagnóstico compreendendo as referidas sondas úteis para o desenvolvimento de um tal ensaio de genotipagem e ensaios para detecção, monitorização ou seguimento de infecção por HBV e ensaios para detecção de mutações de HBV.

Todos os objectivos da presente invenção foram satisfeitos através das seguintes formas de realização específicas.

Como solução para o problema acima mencionado que é essencial para o correcto diagnóstico, monitorização e seguimento de infecção por HBV ter informação sobre o

genótipo de HBV presente, a presente invenção proporciona um modo elegante de abordar problemas de tal complexidade que envolve a existência de uma abordagem de hibridação reversa (particularmente em tiras de Ensaio de Linhas de Sondas, tal como descrito por Stuyver *et al.*, 1993). Utilizando esta tecnologia é possível obter convenientemente todos os dados essenciais numa realização do teste. Para alcançar este objectivo, é necessário desenhar e montar um conjunto de sondas que possa detectar todos os polimorfismos relevantes nas regiões génicas de HBV de interesse.

A presente invenção refere-se assim particularmente a um método para a detecção de ambos os genótipos de HBV das estirpes e de mutantes de HBV resistentes a fármacos numa amostra biológica, compreendendo:

(i) se necessário for, libertação, isolamento ou concentração dos ácidos polinucleicos presentes na referida amostra;

(ii) se necessário for, amplificação da parte relevante de um gene de HBV adequado presente na referida amostra com pelo menos um par de iniciadores adequado;

(iii) hibridação dos ácidos polinucleicos do passo (i) ou (ii) com uma combinação de pelo menos uma sonda de cada um dos seguintes grupos:

- SEQ ID 77, 81, 139-141, 190-194
- SEQ ID 78, 142-147, 149
- SEQ ID 79, 150-161, 204
- SEQ ID 82, 162-169, 208
- SEQ ID 170-176, 213
- SEQ ID 178-189, 214-219,

- opcionalmente um ou mais de SEQ ID 80, 148 e 177, e pelo menos uma sonda de cada um dos seguintes grupos:
- SEQ ID 114, 115, 127-129, 227-234, 243, 249, 250, 261
- SEQ ID 116, 117, 130-133, 244-248, 251-260, 262-266, e/ou pelo menos um sonda de:
- SEQ ID 267 e 269, cada uma juntamente com SEQ ID 268,

(iv) detecção dos híbridos formados no passo (iii);

(v) inferência dos genótipos de HBV e dos mutantes de HBV resistentes a fármacos na referida amostra a partir do sinal ou sinais de hibridação diferenciais obtidos no passo (iv).

As sequências alvo específicas do genótipo podem ser qualquer variação de nucleótidos que surja após alinhamento dos diferentes genomas de HBV o que permite a classificação de um certo isolado de HBV como um certo genótipo (ver Figura 1).

A expressão "parte relevante de um gene de HBV adequado" refere-se à parte do gene de HBV que engloba a sequência alvo específica do genótipo de HBV escolhida a partir da Figura 1 a detectar.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, o passo (iii) é efectuado utilizando sondas todas meticulosamente desenhadas de modo a que apresentem os resultados de hibridação desejados, quando utilizadas num formato de ensaio de hibridação reversa, mais particularmente sob as mesmas condições de hibridação e lavagem implicando que cada uma das referidas sondas é capaz de formar um complexo após hibridação com a sua sequência alvo presente nos ácidos polinucleicos da amostra tal como obtidos após o passo (i) ou (ii).

A numeração dos aminoácidos codificados e dos nucleótidos do gene de HBV é tal como geralmente aceite na literatura. É aqui divulgado um conjunto de sondas que permitem a detecção de uma variação específica do genótipo, incluindo sondas que permitem a detecção de uma sequência de tipo selvagem, uma sequência polimórfica ou uma mutada em qualquer uma das posições nucleotídicas apresentando uma diversidade de sequência após alinhamento de todas as sequências de HBV conhecidas ou por descobrir conforme representado na Figura 1 para todos os genomas de HBV completos verificados em EMBL/NCBI/DDBJ/Genbank.

Os conjuntos de sondas de acordo com a presente invenção têm como característica comum que todas as sondas no referido conjunto são desenhadas de modo a que possam ser utilizadas juntas num ensaio de hibridação reversa, mais particularmente sob condições de hibridação e lavagem semelhantes ou idênticas tal como indicado acima e abaixo.

Os conjuntos de sondas seleccionados incluem sondas que permitem diferenciar qualquer uma das mudanças de nucleótidos específicas do genótipo de HBV tal como representado na Figura 1, de preferência na região HBsAg de HBV. Sendo as referidas sondas caracterizadas por poderem funcionar num método tal como exposto acima.

Para resolver o problema acima mencionado de obtenção de informação sobre a possível presença de mutantes de HBV numa dada amostra, a presente invenção proporciona um modo elegante de abordar este problema que envolve a existência de uma abordagem de hibridação reversa (particularmente em tiras de Ensaio de Sondas em Linha, tal como descrito por Stuyver *et al.*, 1993). Utilizando esta tecnologia é

possível obter convenientemente todos os dados essenciais numa realização do teste. Para alcançar este objectivo, é necessário desenhar e montar um conjunto de sondas que possa detectar todas as mutações relevantes e possivelmente também sequências de tipo selvagem ou polimorfismos nas regiões génicas de HBV de interesse.

É também aqui divulgado um método para a determinação da presença ou ausência de um ou mais mutantes de HBV numa amostra biológica, compreendendo:

(i) se necessário for, libertação, isolamento ou concentração dos ácidos polinucleicos presentes na amostra;

(ii) se necessário for, amplificação da parte relevante de um gene de HBV adequado presente na referida amostra com pelo menos um par de iniciadores adequado;

(iii) hibridação dos ácidos polinucleicos do passo (i) ou (ii) com pelo menos duas sondas nucleotídicas que hibridem especificamente com uma sequência alvo mutante de HBV escolhida a partir do gene de RT-pol de HBV da Figura 1, sendo as referidas sondas aplicadas a locais conhecidos num suporte sólido e sendo as referidas sondas capazes de hibridar com os ácidos polinucleicos do passo (i) ou (ii) sob as mesmas condições de hibridação e lavagem, ou as referidas sondas hibridando especificamente com uma sequência complementar a qualquer uma das referidas sequências alvo, ou uma sequência em que T da referida sequência alvo é substituída por U e o referido conjunto de sondas compreendendo também possivelmente uma ou mais sondas de HBV de tipo selvagem correspondendo à respectiva sequência alvo de HBV mutada;

(iv) detecção dos híbridos formados no passo (iii);

(v) inferência do mutante ou mutantes de HBV presentes na referida amostra a partir do sinal ou sinais de hibridação diferencial obtidos no passo (iv).

Deve entender-se que o termo "sequência alvo mutante" cobre não só a sequência contendo uma mutação, como também a correspondente sequência de tipo selvagem. A sequência alvo mutante de HBV aqui divulgada pode ser qualquer sequência incluindo um codão mutado de HBV conhecido na arte ou ainda a descobrir. As regiões alvo mutantes de HBV particularmente preferidas são expostas abaixo.

Para resolver o problema tal como referido acima de obtenção de informação sobre os assuntos essenciais para um correcto diagnóstico de HBV (nomeadamente o genótipo e diferentes mutações, mutações de escape de vacina e mutações no gene de RT seleccionadas através de tratamento com fármacos tais como lamivudina e penciclovir), a presente invenção proporciona um modo particularmente elegante de obter tal informação complexa.

Além disso, a análise cuidadosa dos dados obtidos pelos presentes inventores revelou claramente que a combinação da informação relativa aos mutantes de escape com dados sobre o genótipo é essencial para permitir a interpretação adequada dos resultados. Assim é altamente vantajoso ser capaz de produzir todos os dados relevantes simultaneamente.

Neste método para diagnóstico de mutantes de HBV em combinação com genotipagem de HBV, pode ser utilizado um conjunto de sondas seleccionado tal como definido acima, em que o referido conjunto de sondas é caracterizado como

sendo escolhido como para uma dada mutação de HBV, sendo as seguintes sondas incluídas no referido conjunto:

- pelo menos uma sonda para detecção da presença do nucleótido ou nucleótidos mutados na referida posição;
- pelo menos uma sonda para detecção da presença do nucleótidos ou nucleótidos de tipo selvagem na referida posição;
- possivelmente também uma ou mais sondas adicionais para detecção de polimorfismos de tipo selvagem nas posições à volta da posição da mutação.

A inclusão dos últimos dois tipos de sondas contribui grandemente para aumentar a sensibilidade dos referidos ensaios tal como demonstrado na secção dos exemplos.

Mais, é divulgada aqui pelo menos uma sonda, de preferência pelo menos duas sondas, caracterizando a presença de uma mutação na região do gene de RT-pol de HBV, que dá origem a resistência a fármacos tais como lamivudina e penciclovir, por exemplo a mutação de M para V ou para I na posição 552 (no motivo YMDD), a mutação de V para I na posição 555, a mutação de F para L na posição 514, a mutação de V para L na posição 521, a mutação de P para L na posição 525 e a mutação de L para M na posição 528 (ver Figura 1).

É ainda divulgada uma combinação de pelo menos duas sondas oligonucleotídicas e a referida combinação de sondas híbrida especificamente com pelo menos dois dos seguintes grupos de sequências alvo:

uma sequência alvo mutante escolhida a partir da região do gene de RT-pol de HBV,

uma sequência alvo mutante escolhida a partir da região HBsAg de HBV,

uma sequência alvo específica do genótipo de HBV da sequência do gene de RT-pol de HBV.

Por exemplo, é aqui divulgada a hibridação com pelo menos uma sonda nucleotídica que hibrida especificamente com uma sequência alvo específica do genótipo escolhida da Figura 1 e pelo menos uma sonda nucleotídica que hibrida especificamente com uma sequência alvo mutante de HBV escolhida da Figura 1.

É ainda aqui divulgada a hibridação com pelo menos um sonda nucleotídica que hibrida especificamente com uma sequência alvo específica do genótipo escolhida da Figura 1 e pelo menos uma sonda nucleotídica que hibrida especificamente com uma sequência alvo mutante de HBV escolhida a partir da região do gene de RT-pol tal como representado na Figura. 1.

É ainda aqui divulgada a hibridação com pelo menos uma sonda nucleotídica que hibrida especificamente com uma sequência alvo específica do genótipo escolhida da Figura 1 e pelo menos uma sonda nucleotídica que hibrida especificamente com uma sequência alvo mutante de escape à vacina de HBV dentro da região HBsAg tal como representado na Figura 1.

Por exemplo, é ainda divulgada a hibridação com pelo menos uma sonda que hibrida especificamente com uma sequência alvo mutante da região de HBV do gene de RT-pol de HBV, e pelo menos uma sonda que hibrida especificamente com uma sequência alvo mutante da região HBsAg de HBV, e pelo menos uma sonda que hibrida especificamente com uma sequência

alvo específica do genótipo da região HBsAg de HBV. De acordo com esta forma de realização, a parte relevante do genoma de HBV pode ser amplificada através da utilização de um par de iniciadores, por exemplo HBPr 75 e HBPr 94.

É ainda aqui divulgado um conjunto de sondas tal como exposto acima compreendendo pelo menos uma, de preferência pelo menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro ou mais sondas para atingir uma, de preferência duas, três ou mais mudanças de nucleótidos que apareçam no alinhamento de genomas de HBV escolhidos a partir do gene de RT-pol de HBV e representados na Figura 1.

Conjuntos seleccionados de sondas incluem sondas derivadas de duas das mesmas regiões ou diferentes de HBV possuindo nucleótidos mutados de HBV, ou adicionalmente também uma terceira (conjunto de) sonda ou sondas caracterizando a presença de uma terceira mutação de HBV em qualquer uma das posições mostradas na Figura 1, ou combinações particulares destas.

É ainda divulgado um conjunto de sondas que permite a detecção simultânea de mutações de HBV nos codões 15, 28 e 29 na região preCore, em combinação com mutações nas regiões promotoras de preCore, em combinação com mutações nos codões 122, 126, 141, 143, 144, 145 na região HBsAg, possivelmente também em combinação com mutações nos codões do gene pol de HBV 514, 521, 525, 528, 552 ou 555.

Nos casos em que é aqui referido o alinhamento de genomas de HBV da Figura 1, deve entender-se como referindo-se a um alinhamento de todos os genomas de HBV existentes e futuros. As sequências do genoma de HBV existentes podem ser

deduzidas a partir de qualquer base de dados, tal como as base de dados EMBL/NCBI/DDBJ/GENBANK.

Um conjunto de sondas preCore, preS1, HBsAg e do gene de RT-pol são as sondas com SEQ ID NO 1 a 278 da Tabela 1 (ver também Figura 1).

Conjuntos específicos de sondas a estes respeito são mostrados na Figura 2 e na Figura 4. As sondas na Figura 2 e na Figura 4 foram recusadas após uma primeira selecção para sondas de preCore, preS1, HBsAg e RT-pol.

As sondas da invenção são desenhadas para obter um desempenho óptimo sob as mesmas condições de hibridação de modo a que possam ser utilizadas em conjuntos de pelo menos 2 sondas para hibridação simultânea. Isto aumenta altamente a utilidade destas sondas e resulta num ganho significativo de tempo e trabalho. Evidentemente, quando fossem preferidas outras condições de hibridação, todas as sondas deveriam ser adaptadas concordantemente através da adição ou deleção de vários nucleótidos nas suas extremidades. Deve ser entendido que estas adaptações concomitantes devem originar essencialmente o mesmo resultado, nomeadamente que as respectivas sondas ainda hibridem especificamente com o alvo definido. Tais adaptações podem também ser necessárias se o material amplificado for ARN na natureza e não ADN como no caso para o sistema NASBA.

A selecção das sondas preferidas da presente invenção baseia-se num formato de ensaio de hibridação reversa utilizando sondas oligonucleotídicas imobilizadas presentes em localizações distintas num suporte sólido. Mais particularmente, a selecção de sondas preferidas da presente invenção baseia-se na utilização do princípio do

Ensaio de Sondas em Linha (LiPA) que é um ensaio de hibridação reversa utilizando sondas oligonucleotídicas imobilizadas como linhas paralelas numa tira de suporte sólido (Stuyver et al. 1993; pedido internacional WO 94/12670). Esta abordagem é particularmente vantajosa uma vez que é rápida e simples de efectuar. O formato de hibridação reversa e mais particularmente a abordagem LiPA tem muitas vantagens práticas em comparação com outras técnicas de ADN ou formatos de hibridação, especialmente quando a utilização de uma combinação de sondas é preferível ou inevitável para obter a informação considerada relevante.

Deve entender-se, no entanto, que qualquer outro tipo de ensaio ou formato de hibridação utilizando qualquer uma das sondas seleccionadas tal como melhor descrito na invenção, está também coberto pela presente invenção.

A abordagem de hibridação reversa implica que as sondas são imobilizadas em certas localizações num suporte sólido e que o ADN alvo seja marcado de modo a permitir a detecção dos híbridos formados.

As seguintes definições servem para ilustrar os termos e as expressões utilizadas na presente invenção.

O termo "análise genética" refere-se ao estudo da sequência nucleotídica do genoma de HBV através de qualquer técnica apropriada.

O termo "mutante de HBV" refere-se a qualquer estirpe de HBV ancorando variações genómicas com consequências serológicas, genéticas ou clínicas.

O termo "mutante de escape à vacina" é revisto na secção de introdução e no Exemplo 7. A região mais importante reside entre o aminoácido 124 e 147 da região HBsAg, mas pode ser estendida do aminoácido 114 ao 150.

O termo "mutante resistente a fármacos tais como lamivudina e penciclovir" é revisto na secção de introdução e no Exemplo 8.

O termo "genótipo de HBV" refere-se a estirpes de HBV com uma variação intergenótipos de 8% ou mais com base numa comparação de genomas completos.

O material alvo nas amostras a analisar pode ser ADN ou ARN, p.ex., ADN genómico, ARN mensageiro, ARN viral ou versões amplificadas destes. Estas moléculas são também designadas ácidos polinucleicos.

É possível utilizar moléculas de ADN genómico ou ARN de amostras susceptíveis de conter HBV nos métodos de acordo com a presente invenção.

Procedimentos de extracção e purificação bem conhecidos estão disponíveis para o isolamento de ARN ou ADN a partir de uma amostra (f.i. em Maniatis *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)).

O termo "sonda" refere-se a oligonucleótidos específicos da sequência de cadeia simples que tenham uma sequência que é complementar à sequência alvo a detectar.

O termo "sequência alvo" tal como referido na presente invenção descreve a sequência nucleotídica de uma parte da

sequência do gene de HBV de tipo selvagem, polimórfica ou mutante que é especificamente detectada através de uma sonda de acordo com a presente invenção. A sequência polimórfica pode englobar um ou mais nucleótidos polimórficos; a sequência mutante pode englobar um ou mais nucleótidos que sejam diferentes da sequência de tipo selvagem. Deve entender-se que o termo "sequência alvo mutante" cobre não só a sequência contendo uma mutação, como também a correspondente sequência de tipo selvagem. As sequências alvo podem referir-se geralmente a posições nucleotídicas únicas, posições de codões, nucleótidos codificando aminoácidos ou a sequências abrangendo qualquer uma das posições anteriores. Na presente invenção a referida sequência alvo inclui frequentemente uma, duas ou mais posições nucleotídicas variáveis. Na presente invenção os ácidos polinucleicos detectados através das sondas da invenção compreenderão a sequência alvo contra a qual a sonda é detectada.

Deve entender-se que o complemento da referida sequência alvo é também uma sequência alvo adequada nalguns casos. As sequências alvo tal como definidas na presente invenção proporcionam sequências que devem ser pelo menos complementares à parte central da sonda que é desenhada para hibridar especificamente com a referida região alvo. Na maioria dos casos a sequência alvo é completamente complementar à sequência da sonda.

O termo "complementar" tal como aqui se utiliza significa que a sequência da sonda de cadeia simples é exactamente o complemento (inverso) da sequência do alvo de cadeia simples, sendo o alvo melhor definido como a sequência onde a mutação a detectar se localiza.

Uma vez que o actual pedido requer a detecção de pares de bases errados únicos, são necessárias condições rigorosas para a hibridação, permitindo em princípio apenas a hibridação de sequências exactamente complementares. No entanto, são possíveis variações no comprimento das sondas (ver abaixo). Deve notar-se também que, uma vez que a parte central da sonda é essencial para as suas características de hibridação, podem ser permissíveis possíveis desvios da sequência da sonda versus a sequência alvo no sentido da cabeça e cauda da sonda quando são utilizadas sequências de sonda maiores. Estas variações, que podem ser concebidas com o conhecimento comum na arte, devem no entanto ser sempre avaliadas experimentalmente, para verificar se resultam em características de hibridação equivalentes às sondas exactamente complementares.

De preferência, as sondas da invenção têm cerca de 5 a 50 nucleótidos de comprimento, de preferência de cerca de 10 a 25 nucleótidos. Comprimentos de sondas particularmente preferidos incluem 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 nucleótidos. Os nucleótidos tal como são utilizados na presente invenção podem ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos e nucleótidos modificados tais como inosina ou nucleótidos contendo grupos modificados que não alteram essencialmente as suas características de hibridação.

As sequências de sonda são representadas ao longo do fascículo como oligonucleótidos de ADN de cadeia simples da extremidade 5' para 3'. É óbvio para o perito na arte que qualquer uma das sondas especificadas abaixo pode ser utilizada como tal, ou na sua forma complementar, ou na sua forma de ARN (em que T é substituída por U).

As sondas de acordo com a invenção podem ser preparadas através de clonagem de plasmídeos recombinantes contendo inserções incluindo as sequências nucleotídicas correspondentes, se necessário for através da clivagem da última a partir dos plasmídeos clonados após utilização das nucleases adequadas e da sua recuperação, p.ex., através de fraccionamento de acordo com o peso molecular. As sondas de acordo com a presente invenção podem também ser sintetizadas quimicamente, por exemplo através do método fosfo-triéster convencional.

O termo "suporte sólido" pode referir-se a qualquer substrato ao qual se possa ligar uma sonda oligonucleotídica, desde que mantenha as suas características de hibridação e desde que o nível de hibridação de fundo permaneça baixo. Habitualmente o substrato sólido será uma placa de microtitulação, uma membrana (p.ex., *nylon* ou nitrocelulose) ou uma microesfera (conta) ou um *chip*. Antes da aplicação na membrana ou fixação pode ser conveniente modificar a sonda de ácido nucleico para facilitar a fixação ou melhorar a eficiência de hibridação. Tais modificações podem englobar o corte de homopolímeros, a ligação com diferentes grupos reactivos tais como grupos alifáticos, grupos NH_2 , grupos SH , grupos carboxílicos ou ligação com biotina, haptenos ou proteínas.

O termo "marcado" refere-se à utilização de ácidos nucleicos marcados. A marcação pode ser realizada através da utilização de nucleótidos marcados incorporados durante o passo de polimerase da amplificação tal como ilustrado por Saiki *et al.* (1988) ou Bej *et al.* (1990) ou iniciadores marcados ou através de qualquer outro método conhecido dos peritos na arte. A natureza do marcador pode ser isotópica

(^{32}P , ^{35}S , etc.) ou não isotópica (biotina, digoxigenina, etc.)

O termo "iniciador" refere-se a uma sequência oligonucleotídica de cadeia simples capaz de actuar como ponto de iniciação para a síntese de um produto de extensão do iniciador que seja complementar à cadeia de ácido nucleico a copiar. O comprimento e a sequência do iniciador têm de ser tais que permitam iniciar a síntese dos produtos de extensão. De preferência, o iniciador tem cerca de 5-50 nucleótidos de comprimento. O comprimento específico e a sequência dependerão da complexidade do ADN ou ARN alvo necessários, bem como das condições de utilização dos iniciadores tais como temperatura e força iónica.

A expressão "par de iniciadores adequado" nesta invenção refere-se a um par de iniciadores que permite a amplificação de parte ou de todo o gene de HBV para o qual são imobilizadas as sondas.

O facto dos iniciadores da amplificação não terem de coincidir exactamente com a sequência molde correspondente para garantir uma amplificação correcta está amplamente documentado na literatura (Kwok et al., 1990).

O método de amplificação utilizado pode ser reacção em cadeia da polimerase (PCR; Saiki et al., 1988), reacção em cadeia da ligase (LCR; Landgren et al., 1988; Wu & Wallace, 1989; Barany, 1991), amplificação baseada na sequência de ácido nucleico (NASBA; Guatelli et al., 1990; Compton, 1991), sistema de amplificação baseado na transcrição (TAS; Kwok et al., 1989), amplificação por deslocamento de cadeias (SDA; Duck, 1990; Walker et al., 1992) ou amplificação por meio da replicase QB (Lizardi et al., 1988; Lomeli et al., 1989) ou qualquer outro método

adequado para amplificar moléculas de ácido nucleico conhecido na arte.

Os oligonucleótidos utilizados como iniciadores ou sondas podem também compreender análogos de nucleótidos tais como fosforotioatos (Matsukura et al., 1987), alquilfosforotioatos (Miller et al., 1979) ou ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen et al., 1991; Nielsen et al., 1993) ou pode conter agentes intercalares (Asseline et al., 1984).

Tal como a maioria de outras variações ou modificações introduzidas nas sequências de ADN originais da invenção estas variações necessitarão de adaptações em relação às condições sob as quais o oligonucleótido deve ser utilizado para obter a especificidade e sensibilidade necessárias. No entanto, os eventuais resultados da hibridação serão essencialmente os mesmos que os obtidos com os oligonucleótidos não modificados.

A introdução destas modificações pode ser vantajosa para influenciar positivamente características tais como a cinética da hibridação, a reversibilidade da formação de híbridos, estabilidade biológica das moléculas oligonucleotídicas, etc.

A "amostra" pode ser qualquer material biológico tomado directamente a partir do ser humano infectado (ou animal), ou após cultura (enriquecimento). O material biológico pode ser, p.ex., expectorações de qualquer tipo, lavagens brônquicas, sangue, tecido de pele, biopsias, esperma, material de cultura de linfócitos sanguíneos, colónias, culturas líquidas, amostras fecais, urina, etc.

Os conjuntos de sondas incluirão pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais sondas. As referidas sondas podem ser aplicadas em duas ou mais (possivelmente tantas como o número de sondas) posições distintas e conhecidas num substrato sólido. Frequentemente é preferível aplicar duas ou mais sondas juntamente numa e na mesma posição do referido suporte sólido.

Para desenho de sondas com as características desejadas, podem ser aplicadas as seguintes linhas directrizes úteis conhecidas do perito na arte.

Devido à extensão e especificidade das reacções de hibridação tais como as aqui descritas estas são afectadas por vários factores, cuja manipulação de um ou mais desses factores determinará a sensibilidade e especificidade exactas de uma determinada sonda, seja perfeitamente complementar ao seu alvo ou não. A importância e o efeito de várias condições de ensaio, melhor explicados aqui, são conhecidos dos peritos na arte.

A estabilidade do híbrido de ácido nucleico (sonda:alvo) deverá ser escolhida para ser compatível com as condições de ensaio. Isto pode ser alcançado evitando sequências longas ricas em AT, através da terminação dos híbridos com pares de bases G:C e através do desenho da sonda com uma T_m apropriada. Os pontos inicial e final da sonda devem ser escolhidos de modo a que o comprimento e a % de GC resultem numa T_f cerca de 2-10°C superior à temperatura à qual o ensaio final será efectuado. A composição em bases da sonda é significativa porque os pares de bases G-C exibem maior estabilidade térmica em comparação com os pares de bases A-T devido a ligações de hidrogénio adicionais. Assim, a hibridação envolvendo ácidos nucleicos complementares de

maior teor em G-C serão estáveis a temperaturas mais elevadas.

Condições tais como a força iónica e a temperatura de incubação sob as quais uma sonda será utilizada devem também ser tidas em conta quando se desenha uma sonda. Sabe-se que a hibridação aumentará à medida que aumenta a força iónica da mistura reaccional e que a estabilidade térmica dos híbridos aumentará com o aumento da força iónica. Por outro lado, reagentes químicos, tais como a formamida, ureia, DMSO e álcoois, que rompem as ligações de hidrogénio, aumentarão o rigor da hibridação. A desestabilização das ligações de hidrogénio através de tais reagentes pode reduzir grandemente a T_f . Em geral, a hibridação óptima para sondas oligonucleotídicas sintéticas de cerca de 10-50 bases de comprimento ocorre aproximadamente 5°C abaixo da temperatura de fusão para um dado duplex. A incubação a temperaturas abaixo do óptimo pode permitir que sequências de bases desemparelhadas hibridem e pode portanto resultar em reduzida especificidade.

É desejável ter sondas que hibridem apenas sob condições de elevado rigor. Sob condições de elevado rigor apenas se formarão híbridos de ácido nucleico altamente complementares; híbridos sem um grau suficiente de complementaridade não se formarão. Concordantemente, o rigor das condições de ensaio determina a quantidade de complementaridade necessária entre duas cadeias de ácido nucleico que formam um híbrido. O grau de rigor é escolhido de modo a maximizar a diferença na estabilidade entre o híbrido formado com o alvo e o ácido nucleico não alvo. No presente caso, é necessário detectar mudanças de apenas um

par de bases, o que requer condições de rigor muito elevado.

O comprimento da sequência de ácido nucleico alvo e, concordantemente, o comprimento da sequência da sonda podem também ser importantes. Nalguns casos, pode haver várias sequências de uma determinada região, variando na localização e no comprimento, que produzirão sondas com as características de hibridação desejadas. Noutros casos, uma sequência pode ser significativamente melhor que outra que difira apenas numa única base. Embora seja possível que os ácidos nucleicos que não são perfeitamente complementares hibridem, o maior trecho de sequência de bases perfeitamente complementares normalmente determinará em primeiro lugar a estabilidade do híbrido. Embora possam ser utilizadas sondas oligonucleotídicas de diferentes comprimentos e composição de bases, as sondas oligonucleotídicas preferidas desta invenção estão entre cerca de 5 a 50 (mais particularmente 10-25) bases de comprimento e têm um trecho suficiente na sequência que é perfeitamente complementar à sequência de ácido nucleico alvo.

Regiões no ADN ou ARN alvo que se sabe formarem estruturas internas fortes inibidoras da hibridação são menos preferidas. De igual modo, sondas com extensa auto-complementaridade devem ser evitadas. Tal como explicado acima, a hibridação é a associação de duas cadeias simples de ácidos nucleicos complementares para formar uma cadeia dupla ligada por hidrogénios. Está implícito que se uma das duas cadeias estiver totalmente ou parcialmente envolvida num híbrido será menos capaz de participar na formação de um novo híbrido. Pode haver híbridos intramoleculares e intermoleculares formados dentro das moléculas de um tipo

de sonda se houver suficiente auto-complementaridade. Tais estruturas podem ser evitadas através do desenho cuidadoso da sonda. Ao desenhar a sonda para que uma porção substancial da sequência de interesse seja de cadeia simples, a taxa e extensão de hibridação pode ser grandemente aumentada. Estão disponíveis programas de computador para pesquisar este tipo de interação. No entanto, em certos casos, pode não ser possível evitar este tipo de interação.

As condições padrão de hibridação e lavagem são divulgadas na secção Materiais e Métodos dos Exemplos. Outras condições são por exemplo SSC 3× (Solução Salina de Sódio com Citrato), FA (Formamida) desionizada a 20% a 50°C.

Podem também ser utilizadas outras soluções (SSPE (Solução salina de sódio com fosfato-EDTA), TMAcI (Cloreto de Tetrametilamónio), etc.) e temperaturas desde que a especificidade e sensibilidade das sondas sejam mantidas. Se necessário for, têm de ser efectuadas ligeiras modificações das sondas no comprimento ou na sequência para manter a especificidade e sensibilidade requeridas sob as dadas circunstâncias.

Numa forma de realização preferencial, os ácidos polinucleicos acima mencionados do passo (i) ou (ii) são hibridados com pelo menos duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, catorze, quinze, dezasseis, dezassete dezoito, dezanove, vinte ou mais das sondas específicas da região alvo acima mencionadas, de preferência com 5 ou 6 sondas, que, tomadas em conjunto, cobrem a "região de mutação" do gene de HBV relevante.

O termo "região de mutação" significa que a região na sequência do gene de HBV relevante onde pelo menos uma

mutação codificando um mutante de HBV está situada numa parte preferida desta região de mutação, representada na Figura 1.

Para além das regiões de mutação tal como definido acima os genomas de tipo selvagem ou mutantes de HBV podem também mostrar variações nucleotídicas polimórficas em posições diferentes das referidas como posições variadas específicas do genótipo ou específicas do mutante tal como mostrado na Figura 1.

Uma vez que algumas mutações podem ser de ocorrência mais frequente que outras, p.ex., em certas áreas geográficas ou em circunstâncias específicas (p.ex., comunidades relativamente fechadas) pode ser apropriado pesquisar apenas mutações específicas, utilizando um conjunto seleccionado de sondas tal como indicado acima. Isto resultaria num teste mais simples, que cobriria as necessidades sob certas circunstâncias.

Para detectar genótipos de HBV e mutantes de HBV com o conjunto seleccionado de sondas oligonucleotídicas, pode ser utilizado qualquer método de hibridação conhecido na arte (*dot-blot* convencional, *Southern blot*, sanduíche, etc.).

No entanto, para obter resultados rápidos e fáceis se estiver envolvida uma pluralidade de sondas, pode ser muito conveniente um formato de hibridação reversa.

Numa forma de realização preferida o conjunto de sondas seleccionado é imobilizado num suporte sólido em localizações distintas conhecidas (pontos, linhas ou outras figuras). Noutra forma de realização preferida o conjunto

de sondas seleccionado é immobilizado numa tira de membrana de um modo em linha. As referidas sondas podem ser immobilizadas individualmente ou como misturas para delinear localizações no suporte sólido.

Uma forma de realização específica e muito fácil de utilizar do método preferencial acima mencionado é o método LiPA, onde o conjunto de sondas acima mencionado é immobilizado em linhas paralelas numa membrana, tal como melhor descrito nos exemplos.

A invenção proporciona também um conjunto de iniciadores permitindo a amplificação da região do respectivo gene de HBV a detectar por meio das sondas. Exemplos de tais iniciadores da invenção são dados na Tabela 1 e na Figura 1.

Os iniciadores podem ser marcados com um marcador à escolha (p.ex., biotina). Podem ser utilizados diferentes sistemas de amplificação do alvo baseados em iniciadores, e de preferência amplificação por PCR, tal como exposto nos exemplos. Pode ser utilizada PCR de um único ciclo ou interna.

A invenção proporciona também um estojo de ensaio de acordo com a reivindicação 3.

O termo "tampão de hibridação" significa um tampão que permite que uma reacção de hibridação ocorra entre as sondas e os ácidos polinucleicos presentes na amostra, ou os produtos amplificados, sob as condições de rigor apropriadas.

O termo "solução de lavagem" significa uma solução que permite a lavagem dos híbridos formados sob as condições de rigor apropriadas.

Tal como ilustrado nas secção dos Exemplos, foi desenhado um ensaio de sondas em linha (LiPA) para pesquisa de genótipos de HBV e/ou mutantes de HBV. O princípio do ensaio baseia-se na hibridação reversa de um ácido polinucleico amplificado tal como um fragmento de PCR biotinilado do gene de HBV sobre oligonucleótidos curtos. O último híbrido pode então, através de uma ligação biotina-estreptavidina, ser detectado com um sistema de revelação de cor não radioactivo.

Os seguintes exemplos servem apenas para ilustrar a presente invenção. Não se pretende que de modo algum estes exemplos limitem o âmbito da presente invenção.

LEGENDAS DAS FIGURAS E DA TABELA

Figura 1: Alinhamento de 35 genomas completos de HBV. Os isolados pertencentes ao genótipo A são: HBVXCPS, HBVADW, HVHEPB, S50225, HPBADWZCG; genótipo B: HPBADW3, HPBADWZ, HPBADW1, HPBADW2; genótipo C: HPBCGADR, HBVADRM, HPBADRA, HPBCG, HEHBVAYR, HBVADR, HBVADR4, HPBADR1C, HPBADRC, HBVPREX, HPBETNC, HHVBC, HHVCCCHA; genótipo D: HBVAYWMCG, HBVAYWC, HBVAYWCI, HBVAYWE, HBVDNA, HPBHBVAA, XXHEPAV, HBVORFS; genótipo E: HHVBE4, HHVBBAS; e genótipo F: HHBF, HHVBFFOU, HBVADW4A. Para conservar o alinhamento, foram criados vários intervalos no alinhamento que estão indicados com /. As posições de início e fim dos diferentes genes de HBV codificados estão indicadas: HBsAg: antigénio de superfície da hepatite B (antigénio de superfície pequeno); HBx: proteína X de hepatite B; Pol de HB: proteína polimerase de hepatite B, codificando uma proteína

terminal, um espaçador, uma região de RT/ADN-polimerase, e uma actividade de ARNase H; HBcAg: antigénio Core de hepatite B; HBpreS1Ag: antigénio preS1 de hepatite B (antigénio de superfície grande); HBpreS2Ag: antigénio preS2 de hepatite B (antigénio de superfície médio). A posição dos iniciadores de PCR está indicada com uma grande caixa ao longo de todas as 35 sequências. A polaridade do iniciador de PCR pode ser deduzida a partir da posição do nome acima destas caixas: esquerda = iniciador anti-sentido; direita = iniciador com sentido. As sondas de LiPA estão indicadas com caixas pequenas, os números das sondas estão indicados a seguir às sondas ou à direita do alinhamento, e correspondem aos números das sondas na Tabela 1.

Figura 2: Desenho de LiPA de HBV. É detalhado o conteúdo da tira de LiPA de HBV. Para o número de cada linha, está indicada a região do genoma viral, juntamente com o genótipo que é detectado, o número da sonda que corresponde às caixas do alinhamento na Figura 1, e a sequência da sonda.

Figura 3: Resultado combinado da determinação do genótipo na região preS1 e do varrimento de preCore em 24 amostras. A interpretação de cada amostra é dada sob cada tira. As reactividades das sondas nas linhas 3 a 14 são obtidas a partir do fragmento de PCR de preS1, as reactividades das sondas nas linhas 15 a 27 são devidas ao fragmento de PCR de preCore. Os genótipos estão indicados de A a F. A interpretação para a região preCore é como se segue: W = tipo selvagem; M = mutante; I = indeterminado, significando que não foi observada reactividade, o que é devido a mutações que não puderam ainda ser detectadas com as sondas seleccionadas; mix = mistura do tipo selvagem e mutante; a

interpretação do codão 15 é relevante apenas para o genótipo A, a ausência de reactividade em HBPr 45 para os genótipos B a F é inútil tal como é indicado por - (não aplicável). Uma vez que a presença ou ausência de mutações em preCore tem efeito no estado serológico de HBeAg, isto está também indicado.

Figura 4: Sondas utilizadas em LiPA de HBV. As sondas foram desenhadas para genotipagem na região de HBsAg e para detecção de mutações de resistência a fármacos no motivo YMDD (ver também Figura 5), bem como para detecção de mutações na região preCore (ver também Figura 6).

Figura 5: Exemplo de um ensaio LiPA combinando genotipagem de HBV na região HBsAg e detecção de mutações de resistência a fármacos no motivo YMDD. Os genótipos estão indicados de A a F. O desenho da tira é mostrado à direita, com os números das sondas correspondendo aos números na Tabela 1 e na Figura 4. Os genótipos e motivos mutantes com os quais cada sonda hibrida estão escritos mais à direita. A combinação de sondas reactivas permite a determinação de um genótipo único.

Figura 6: Exemplo da determinação de mutações preCore através da técnica LiPA. O desenho da tira é mostrado à direita, com os números das sondas correspondendo aos números na Tabela 1. As sequências alvo mutantes com as quais as sondas hibridam estão indicadas mais à direita. O motivo M2 corresponde a uma mutação no codão 28, M4 corresponde a uma mutação no codão 29. M2/M4 tem mutações em 28 e 29.

Figura 7: Detecção de uma mutação no motivo YMDD de pol de HBV após tratamento com lamivudina. O gráfico mostra um

curso de tempo da carga viral durante o tratamento com lamivudina. À direita são mostradas tiras de LiPA, correspondendo aos ensaios no início do tratamento (5/95), 10 meses de tratamento (2/96) e 14 meses de tratamento (6/96). O ensaio mostra que durante o tratamento o motivo YMDD muta para YVDD.

Tabela 1: Perspectiva geral de todos os iniciadores e sondas referidos nas Figuras com uma indicação da sua respectiva SEQ ID NO e da região do genoma de HBV para a qual são desenhados. Os iniciadores da região PreS1 incluem 1, 106, 2 (iniciadores com sentido) e 4, 107 e 3 (iniciadores anti-sentido). Os iniciadores da região HBsAg incluem 75 e 104 (iniciadores com sentido) e 76, 94 e 105 (iniciadores anti-sentido). Os iniciadores da região PreCore incluem 5, 6, 69, 70, 84, 86, 87 e 108 (iniciadores com sentido) e 7, 8, 85 e 109 (iniciadores anti-sentido). Os restantes oligonucleótidos são sondas das regiões PreCore, PreS1, HBsAg e gene de RT-pol de HBV tal como indicado. O motivo YMDDV e os seus mutantes consistem nos aminoácidos 551 a 555 da proteína RT-pol; a sequência MGVL e o seu mutante consistem nos aminoácidos 519 a 523 da proteína RT-pol; a sequência SPFL e os seus mutantes e variantes genotípicas consistem nos aminoácidos 524 a 528 da proteína RT-pol.

Tabela 1 : Desenho de sondas e iniciadores de HBV

Nome	Sequência	SEQ ID NO	Região
HBPr1	GGGTCACCATATTCTTGGG	1	iniciador de preS1 com sentido
HBPr2	GAACAAGAGCTACAGCATGGG	2	iniciador de preS1 com sentido
HBPr3	CCACTGCATGGCCTGAGGATG	3	iniciador de preS1 anti-sentido
HBPr4	GTTCTT/GGAACAGGGCGCCACCAG	4	iniciador de preS1 anti-sentido
HBPr5	TCTTTGTATTAGGAGGCTGTAG	5	iniciador de preCore com sentido
HBPr6	GCTGTAGGCATAAATTGGTCTG	6	iniciador de preCore com sentido

HBPr7	CTCCACAGT/AAGCTCCAAATTC	7	iniciador de preCore anti- sentido
HBPr8	GAAGGAAAGAAGTCAGAAGGC	8	iniciador de preCore anti- sentido
HBPr9	TGGCTTTGGGGCATGG	9	preCore
HBPr10	TGGCTTTAGGGCATGG	10	preCore
HBPr11	TGGCTTTAGGACATGG	11	preCore
HBPr12	AAGTTGCATGGTGCTG	12	preCore
HBPr13	CACCTCTGCCTAATCAT	13	preCore
HBPr14	TGGGGTGGAGCCCTCAG	14	preS1
HBPr15	CCCACCAGCCAACCAG	15	preS1
HBPr16	CCCATGGGGGACTGT	16	preS1
HBPr17	AACCCCAACAAGGATG	17	preS1
HBPr18	TCCACCAGCAATCCT	18	preS1
HBPr19	TGGGGGAAGAATATTT	19	preS1
HBPr20	AAATTCCAGCAGTCCC	20	preS1
HBPr21	GTTCCCMCCCTCTGG	21	preS1
HBPr22	MCCTCGCMAGGCAT	22	preS1
HBPr23	TGCATTCAAAGCCAAC	23	preS1
HBPr24	TACTCACAACGTGCC	24	preS1
HBPr25	ACCCTCCGTTCCGAGC	25	preS1
HBPr26	CACGAAGACAGCCTAC	26	preS1
HBPr27	GATCCAGCCTTCAGAG	27	preS1
HBPr28	ATGCTCCAGCTCCTAC	28	preS1
HBPr29	GCTTTCTTGGACGGTC	29	preS1
HBPr30	CTACCCCAATCACTCC	30	preS1
HBPr31	AGCACCTCTCTCAACG	31	preS1
HBPr32	CCAATGGCAAACAAGG	32	preS1
HBPr33	CTGACGGCTCCACCCCA	33	preS1
HBPr34	ATGCMCTTTTTCACC	34	preCore
HBPr35	ATCTCTTGTACATGTC	35	preCore
HBPr36	ATCTCATGTTTCATGTC	36	preCore
HBPr37	CAGTGGGACATGTACA	37	preCore
HBPr38	CAGTAGGACATGAACA	38	preCore
HBPr39	CTGTTCAAGCCTCCAA	39	preCore
HBPr40	AGCCTCCAAGCTGTGC	40	preCore
HBPr41	AAAGCCACCCAAGGCA	41	preCore
HBPr42	TGGCTTTAGGACATGGA	42	preCore
HBPr43	GACATGTACAAGAGATGA	43	preCore
HBPr44	GACATGAACATGAGATCA	44	preCore
HBPr45	TGTACATGTCCCACTGTT	45	preCore
HBPr46	TGTTTCATGTCTACTGTT	46	preCore
HBPr47	ACTGTTCAAGCCTCCAAG	47	preCore
HBPr48	GGCACAGGCTTGAGGCIT	48	preCore
Nome	Sequência	SEQ ID NO	Região
HBPr49	AAAGCCACCCAAGGCACA	49	precore
HBPr50	CCCACACGGTTGGGAAC	50	preS1
HBPr51	CAGCATGGGGCAGAATCT	51	preS1
HBPr52	TCCACCAGCAATCCTCTG	52	preS1
HBPr53	GGATCCAGCCTTCACAGC	53	preS1
HBPr54	TCAGGAAGACAGCCTAC	54	preS1
MBPr55	TTCAACCCCAACAAGGATC	55	preS1
HBPr56	AATGCTCCAGCTCCTAC	56	preS1
HBPr57	CTGCATTCAAAGCCAACT	57	preS1
HBPr58	CCCCATGGGGGACTGTTG	58	preS1
HBPr59	CATACTCACAACTGTGCCA	59	preS1
HBPr60	GGGCTTTCTTGGACGGTCC	60	preS1
HBPr61	CTCTCGAATGGGGGAAGA	61	preS1
HBPr62	CCTACCCCAATCACTCCA	62	preS1
HBPr63	ACCACCTCTCTCAACGACA	63	preS1

HBPr64	GCAAATTCAGCAGTCCCG	64	preS1
HBPr65	GCCAATCGCAAACAAGGTA	65	preS1
HBPr66	GACATGAACATGACATG	66	preCore
HBPr67	GGACATCAACAAGAGAT	67	preCore
HBPr68	GACATGTACAAGAGATG	68	preCore
HBPr69	ACATAAGAGGACTCTTGGAC	69	iniciador de preCore com sentido
HBPr70	TACTTCAAAGACTGTGTGTTTA	70	iniciador de preCore com sentido
HBPr71	ACAAAGACCTTTAAC/TCT	71	promotor de preCore
HBPr72	ACAAAGATCATTAAC/TCT	72	promotor de preCore
HBPr73	TTCCACCAGCAATCCTC	73	preS1
HBPr74	GATCCAGCCTTCAGAGC	74	preS1
HBPr75	CAAGGTAGTTGCCCGTTGTCC	75	iniciador de HBsAg com sentido
HBPr76	CCAAACAGTGGGGGAAGCCC	76	iniciador de HBsAg anti-sentido
HBPr77	CTACGGATGGAATTTGC	77	codão 115 de HBsAg de tipo selvagem
HBPr78	TACGGACGGAAACTGC	78	codão 145 de HBsAg de tipo selvagem
HBPr79	TTCGGACGGAAACTGC	79	codão 145 de HBsAg de tipo selvagem
HBPr80	CTTCGGACGGAAATTGC	80	codão 145 de HBsAg de tipo selvagem
HBPr81	CTACGGATAGAAATTGC	81	codão 145 de HBsAg mutante
HBPr82	CTTCGGACAGAAATTGC	82	codão 145 de HBsAg mutante
HBPr83	CTATGGGAGTGGGCCTCAGT/CC	83	Pol de HB
HBPr84	GCTGTAGGCATAAATTGGTCTG	84	iniciador de preCore com sentido
HBPr85	CTCCACAGT/AAGCTCCAAATTC	85	iniciador de preCore anti- sentido
HBPr86	ACATAAGAGGACTCTTGGAC	86	iniciador de preCore com sentido
HBPr87	TACTTCAAGGACTGTGTGTTTA	87	iniciador de preCore com sentido
HBPr88	TAGGTTAAAGGTCTTTGT	88	promotor de preCore
Nome	Sequência	SEQ ID NO	Região
HBPr89	TAGGTTAATCATCTTTGT	89	promotor de preCore
HBPr90	CATGTCCCACTGTTCAA	90	preCore
HBPr91	CATGTCCTACTGTTCAA	91	preCore
HBPr92	TTCTGCCCCATGCTGTA	92	preS1
HBPr93	TTCTCCCCCATGCTGTAC	93	preS1
HBPr94	GGTAA/TAAAGGACTCAC/AGATG	94	iniciador de HBsAg anti-sentido
HBPr95	TCACCTATATGGATGAT	95	Pol de HB
HBPr96	CAGCTATATGGATGAT	96	Pol de HB
HBPr97	TTCAGCTATATGGATG	97	Pol de HB
HBPr98	TCAGTTATATGGATGAT	98	Pol de HB
HBPr99	TTTCAGTTATATGGATG	99	Pol de HB
HBPr100	TTTAGTTATATGGATGA	100	Pol de HB

HBPr101	TCAGCTATGTGGATGAT	101	Pol de HB
HBPr102	TCAGTTATGTGGATCAT	102	Pol de HB
HBPr103	TTTCAGCTATGTGGATG	103	Pol de HB
HBPr104	CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCC	104	iniciador de HBsAg com sentido
HBPr105	GGT/CAA/TAAACGGACTCAC/AGATG	105	iniciador de HBsAg anti-sentido
HBPr106	GGGTCACCATATTCTTGGG	106	iniciador de preS1 com sentido
HBPr107	GTTCTT/GGAACTGGAGCCACCAG	107	iniciador de preS1 anti-sentido
HBPr108	CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTCA CCTCTGCCTAATC	108	iniciador de preCore com sentido
HBPr109	CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAATGT TGCATGGTGCTGG	109	iniciador de preCore anti-sentido
HBPr110	CCTCTGCCGATCCATACTGCGGAAC	110	iniciador de preX com sentido
HBPr111	CTGCGAGGCGAGGGAGTTCTTCTTC	111	iniciador de HB Core anti-sentido
HBPr112	TGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGC	112	iniciador de HBPsAg com sentido
HBPr113	CCGGCAGATGAGAAGGCACAGACGG	113	iniciador de HBX anti-sentido
HBPr114	TTCAGCTATATGGATGAT	114	motivo YMDD
HBPr115	TCAGCTATATGCATGATG	115	motivo YMDD
HBPr116	TTCAGCTATGTGGATGAT	116	motivo YMDD
HBPr117	TCAGCTATGTGGATGATG	117	motivo YMDD
HBPr118	GGCTTTGGGGCATGG	118	codão 28 de preCore de tipo selvagem
HBPr119	TGGCTTTGGGGCATG	119	codão 28 de preCore de tipo selvagem
HBPr120	GTGGCTTTGGGGCATG	120	codão 28 de preCore de tipo selvagem
HBPr121	GGCTTTGGGGCCATGGA	121	codão 28 de preCore de tipo selvagem
HBPr122	TGGCTTTGGGACATGG	122	codão 28 de preCore de tipo selvagem, codão 29 mutante
HBPr123	GGCTTTGGGACATGG	123	codão 28 de preCore de tipo selvagem, codão 29 mutante
Nome	Sequência	SEQ ID NO	Região
HBPr124	TGGCTTTGGGACATG	124	codão 28 de preCore de tipo selvagem, codão 29 mutante
HBPr125	GTGGCTTTGGGACATG	125	codão 28 de preCore de tipo selvagem, codão 29 mutante
HBPr126	GGCTTTGGGACATGGA	126	codão 28 de preCore de tipo selvagem, codão 29 mutante
HBPr127	TCAGTTATATGGATGATG	127	genótipo D de

HBPr128	TTCAGTTATATGGATGAT	128	YMDD, tipo selvagem
HBPr129	TTTCAGTTATATGGATGAT	129	genótipo D de YMDD, tipo selvagem
HBPr130	TCAGTTATGTGGATGATG	130	genótipo D de YMDD, mutante
HBPr131	TTCAGTTATGTGGATGAT	131	genótipo D de YMDD, mutante
HBPr132	TTTCAGTTATGTGGATGAT	132	genótipo D de YMDD, mutante
HBPr133	TTTCAGTTATGTGGATGA	133	genótipo D de YMDD, mutante
HBPr134	TGCTGCTATGCCTCATCTTC	134	iniciador de HBsAg externa com sentido
HBPr135	CA (G/A) AGACAAAAGAAAATTGG	135	iniciador de HBsAg externa anti-sentido
HBPr136	CTATGGATGGAAATTGC	136	mutante de HBsAg codão 143
HBPr137	CCTATGGATGGAAATTG	137	mutante de HBsAg codão 143
HBPr138	ACCTATGGATGGAAATT	138	mutante de HBsAg codão 143H
HBPr139	CT CAA GGC AAC TCT ATG TGG	139	HBsAg, genótipo A
HBPr140	CT CAA GGC AAC TCT ATG GG	140	HBsAg, genótipo A
HBPr141	T CAA GGC AAC TCT ATG TTG	141	HBsAg, genótipo A
HBPr142	ATC CCA TCA TCT TGG G	142	HBsAg, genótipo B
HBPr143	ATC CCA TCA TCT TGG GCG G	143	HBsAg, genótipo B
HBPr144	TC CCA TCA TCT TGG GCG G	144	HBsAg, genótipo B
HBPr145	C CCA TCA TCT TGG GCT GG	145	HBsAg, genótipo B
HBPr146	TTC GCA AAA TAC CTA TGG	146	HBsAg, genótipo B
HBPr147	T TTC GCA AAA TAC CTA TG	147	HBsAg, genótipo B
HBPr148	CT TTC GCA AAA TAC CTA TG	148	HBsAg, genótipo B
HBPr149	TC GCA AAA TAC CTA TGG G	149	HBsAg, genótipo B
HBPr150	T CTA CTT CCA GGA ACA T	150	HBsAg, genótipo C
HBPr151	T CTA CTT CCA GGA ACA TC	151	HBsAg, genótipo C
HBPr152	CT CTA CTT CCA GGA ACA T	152	HBsAg, genótipo C
HBPr153	CT CTA CTT CCA GGA ACA G	153	HBsAg, genótipo C
HBPr154	C TGC ACG ATT CCT GCT	154	HBsAg, genótipo C
HBPr155	TGC ACG ATT CCT GCT CA	155	HBsAg, genótipo C
HBPr156	C TGC ACG ATT CCT GCT C	156	HBsAg, genótipo C
HBPr157	TGC ACG ATT CCT GCT CAA	157	HBsAg, genótipo C
HBPr158	TTC GCA AGA TTC CTA TG	158	HBsAg, genótipo C
HBPr159	CT TTC GCA AGA TTC CTA T	159	HBsAg, genótipo C
Nome	Sequência	SEQ ID NO	Região
HBPr160	CT TTC GCA AGA TTC CTA	160	HBsAg, genótipo C
HBPr161	CT TTC GCA AGA TTC CTA TG	161	HBsAg, genótipo C
HBPr162	C TCT ATG TAT CCC TCC T	162	HBsAg, genótipo D
HBPr163	TCT ATG TAT CCC TCC TG	163	HBsAg, genótipo D
HBPr164	C TCT ATG TAT CCC TCC TGG	164	HBsAg, genótipo D
HBPr165	CC TCT ATG TAT CCC TCC T	165	HBsAg, genótipo D
HBPr166	C TGT ACC AAA CCT TCG G	166	HBsAg, genótipo D
HBPr167	C TGT ACC AAA CCT TCG	167	HBsAg, genótipo D
HBPr168	GC TGT ACC AAA CCT TCG G	168	HBsAg, genótipo D
HBPr169	TGT ACC AAA CCT TCG GAG	169	HBsAg, genótipo D
HBPr170	GGA CCC TGC CGA ACC T	170	HBsAg, genótipo E
HBPr171	GGA CCC TGC CGA ACC G	171	HBsAg, genótipo E

HBPr172	G GGA CCC TGC CGA AC	172	HBsAg, genótipo E
HBPr173	GGA CCC TGC CGA AC	173	HBsAg, genótipo E
HBPr174	GT TGC TGT TCA AAA CCT T	174	HBsAg, genótipo E
HBPr175	GT TGC TGT TCA AAA CCT G	175	HBsAg, genótipo E
HBPr176	TGT TGC TGT TCA AAA CCT G	176	HBsAg, genótipo E
HBPr177	A TGT TGC TGT TCA AAA CCT G	177	HBsAg, genótipo E
HBPr178	GA TCC ACG ACC ACC A	178	HBsAg, genótipo F
HBPr179	GGA TCC ACG ACC ACC A	179	HBsAg, genótipo F
HBPr180	GGA TCC ACG ACC ACC	180	HBsAg, genótipo F
HBPr181	GA TCC ACG ACC ACC AGG	181	HBsAg, genótipo F
HBPr182	TGT TCC AAA CCC TCG G	182	HBsAg, genótipo F
HBPr183	C TGT TCC AAA CCC TCG	183	HBsAg, genótipo F
HBPr184	C TGT TCC AAA CCC TCG G	184	HBsAg, genótipo F
HBPr185	GT TCC AAA CCC TCG GAT	185	HBsAg, genótipo F
HBPr186	G CCA AAT CTG TGC AGC	186	HBsAg, genótipo F
HBPr187	CCA AAT CTG TGC AGC AT	187	HBsAg, genótipo F
HBPr188	G CCA AAT CTG TGC AGC AG	188	HBsAg, genótipo F
HBPr189	GG CCA AAT CTG TGC AGC	189	HBsAg, genótipo F
HBPr190	A TCA ACA ACA ACC AGT A	190	HBsAg, genótipo A
HBPr191	GA TCA ACA ACA ACC AGT	191	HBsAg, genótipo A
HBPr192	GA TCA ACA ACA ACC AGT A	192	HBsAg, genótipo A
HBPr193	GGA TCA ACA ACA ACC AGT	193	HBsAg, genótipo A
HBPr194	T CAA GGC AAC TCT ATG TGG	194	HBsAg, genótipo A
HBPr195	AGG TTA AAG GTC TTT GT	195	promotor genótipo A tipo selvagem
HBPr196	T AGG TTA AAG GTC TTT GG	196	promotor genótipo A tipo selvagem
HBPr197	TT AGG TTA AAG GTC TTT	197	promotor genótipo A tipo selvagem
HBPr198	GG TTA AAG GTC TTT GTA GG	198	promotor genótipo A tipo selvagem
HBPr199	AGG TTA ATG ATC TTT GT	199	promotor genótipo A mutante
HBPr200	T AGG TTA ATG ATC TTT GG	200	promotor genótipo A mutante
HBPr201	CT TTC GCA AGA TTC CTA TGG	201	HBsAg genótipo C codão 160
HBPr202	GCT TTC GCA AGA TTC CTA TG	202	HBsAg genótipo C codão 160
HBPr202	GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG	203	HBsAg genótipo C codão 160
HBPr204	CT TTC GCA AGA TTC CTA TGG	204	HBsAg genótipo C codão 160
HBPr205	GC TGT ACC AAA CCT TCG GAG	205	HBsAg genótipo D codão 140
HBPr206	TGC TGT ACC AAA CCT TCG G	206	HBsAg genótipo D codão 140
HBPr207	TGC TGT ACC AAA CCT TCG GAG	207	HBsAg genótipo D codão 140
HBPr208	GC TGT ACC AAA CCT TCG GAT	200	HBsAg genótipo D codão 140
Nome	Sequência	SEQ ID NO	Região
HBPr209	TGG TTC GCC GGG CTT T	209	HBsAg genótipo E codão 184
HBPr210	G TGG TTC GCC GGG CTT G	210	HBsAg genótipo E codão 184
HBPr211	GG TTC GCC GGG CTT TC	211	HBsAg genótipo E codão 184
HBPr212	TGG TTC GCC GGG CTT TC	212	HBsAg genótipo E codão 184
HBPr213	AG TGG TTC GCC GGG CTG G	213	HBsAg genótipo E codão 184
HBPr214	A GGA TCC ACC ACC ACC AGG	214	HBsAg genótipo F

HBPr215	A GGA TCC ACG ACC ACC AGT	215	HBsAg genótipo F
HBPr216	CA GGA TCC ACG ACC ACC AGG	216	HBsAg genótipo F
HBPr217	C TGT TCC AAA CCC TCG GAG	217	HBsAg genótipo F
HBPr218	C TGT TCC AAA CCC TCG GAT	218	HBsAg genótipo F
HBPr219	GC TGT TCC AAA CCC TCG GAG	219	HBsAg genótipo F
HBPr220	CTGAACCTTTACCCCGTTGC	220	iniciador de
			estimulador
HBPr221	CTCGCCAACCTTACAAGGCCTTTC	221	iniciador de
			estimulador
HBPr222	AGAATGGCTTGCCCTGAGTGC	222	iniciador de Core
			anti-sentido
HBPr223	GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG	223	HBsAg genótipo C
	G		codão 160
HBPr224	G GCT TTC GCA AGA TTC CTA	224	HBsAg genótipo C
	TGG		codão 160
HBPr225	G GCT TTC GCA AGA TTC CTA	225	HBsAg genótipo C
	TGG G		codão 160
HBPr226	G GCT TTC GCA AGA TTC CTA	226	HBsAg genótipo C
	TGG GA		codão 160
HBPr227	C AGC TAT ATG GAT GAT GTG	227	motivo YMDDV
HBPr228	AGC TAT ATG GAT GAT GTG GG	228	motivo YMDDV
HBPr229	GC TAT ATG GAT GAT GTG GT	229	motivo YMDDV
HBPr230	AGC TAT ATG GAT GAT GTG GT	230	motivo YMDDV
HBPr231	C AGC TAT ATG GAT GAT ATA	231	motivo YMDDI
HBPr232	AGC TAT ATG GAT GAT ATA GG	232	motivo YMDDI
HBPr233	GC TAT ATG GAT GAT ATA GT	233	motivo YMDDI
HBPr234	AGC TAT ATG GAT GAT ATA GT	234	motivo YMDDI
HBPr235	CCA TCA TCT TGG GCT TG	235	HBsAg genótipo B
			codão 155
HBPr236	CA TCA TCT TGG GCT TT	236	HBsAg genótipo B
			codão 155
HBPr237	CCA TCA TCT TGG GCT TT	237	HBsAg genótipo B
			codão 155
HBPr238	CCA TCA TCT TGG GCT TTC	238	HBsAg genótipo B
			codão 155
HBPr239	CCC ACT GTC TGG CTT TC	239	HBsAg genótipo B
			codão 190
HBPr240	CC ACT GTC TGG CTT TC	240	HBsAg genótipo B
			codão 190
HBPr241	CC ACT GTC TGG CTT T	241	HBsAg genótipo B
			codão 190
HBPr242	CCC ACT GTC TGG CTT G	242	HBsAg genótipo B
			codão 190
HBPr243	TAT ATG GAT GAT GTG GTA	243	motivo YMDDV
HBPr244	TAT GTG GAT GAT GTG GTA	244	motivo YVDDV
HBPr245	TAT ATA GAT GAT GTG GTA	245	motivo YIDDV
HBPr246	TAT ATT GAT GAT GTG GTA	246	motivo YIDDV
HBPr247	TAT GTA GAT GAT GTG GTA	247	motivo YVDDV
HBPr248	TAT GTT GAT GAT GTG GTA	248	motivo YVDDV
HBPr249	TAT ATG GAT ATA GTA	249	motivo YMDDI
HBPr250	TAT ATG GAT ATC GTA	250	motivo YMDDI
Nome	Sequência	SEQ ID NO	Região
HBPr251	TAT GTG GAT GAT ATA GTA	251	motivo YVDDI
HBPr252	TAT GTG GAT GAT ATC GTA	252	motivo YVDDI
HBPr253	TAT ATA GAT GAT ATA GTA	253	motivo YIDDI
HBPr254	TAT ATA GAT GAT ATC GTA	254	motivo YIDDI
HBPr255	TAT ATT GAT GAT ATA GTA	255	motivo YIDDI
HBPr256	TAT ATT GAT GAT ATC GTA	256	motivo YIDDI
HBPr257	TAT GTA GAT GAT ATA GTA	257	motivo YVDDI
HBPr258	TAT GTA GAT GAT ATC GTA	258	motivo YVDDI
HBPr259	TAT GTT GAT GAT ATA GTA	259	motivo YVDDI
HBPr260	TAT GTT GAT GAT ATC GTA	260	motivo YVDDI

HBPr261	TAT ATG GAT GAT CTG GTA	261	motivo YMDDL
HBPr262	TAT GTG GAT GAT CTG GTA	262	motivo YVDDL
HBPr263	TAT ATA GAT GAT CTG GTA	263	motivo YIDDL
HBPr264	TAT ATT GAT GAT CTG GTA	264	motivo YIDDL
HBPr265	TAT GTA GAT GAT CTG GTA	265	motivo YVDDL
HBPr266	TAT GTT GAT GAT CTG GTA	266	motivo YVDDL
HBPr267	T ATG GGA GTG GGC CTC AG	267	MGVGL
HBPr268	T ATG GGA TTG GGC CTC AG	268	MGLGL
HBPr269	C AGT CCG TTT CTC TTG GC	269	SPFLL

EXEMPLOS

Exemplo 1. Preparação e amplificação por PCR de ADN de HBV

Foram colhidas amostras de soro de indivíduos positivos para HBsAg e armazenadas a menos 20°C até à utilização em alíquotas de 0,5 mL. Para preparar o genoma viral, foram misturados 18 µL de soro com 2 µL de NaOH 1 N e incubados a 37°C durante 60 minutos. A desnaturação foi parada e neutralizada através da adição de 20 µL de HCl 0,1 N. Após um passo de centrifugação de 15 minutos, o sobrenadante foi colhido e o sedimento descartado. A PCR foi realizada neste lisado como se segue: foram misturados 32 µL de H₂O com 5 µL de tampão de PCR 10×, 1 µL de dXTPs 10 mM, 1 µL de cada iniciador biotinilado (10 pmol/µL), 10 µL de lisado de soro, e 2 U de enzima Taq. O esquema de amplificação continha 4 ciclos de 95°C 1 min, ligação a 45°C durante 1 min, e extensão a 72°C durante 1 min. Os produtos de amplificação foram visualizados num gel de agarose a 3%.

O conjunto de iniciadores externos para preS1 tem a seguinte sequência:

externo com sentido: HBPr 1: 5'-bio-GGGTCACCATATTCTTGGG- 3'

externo anti-sentido: HBPr 4: 5'-bio-GTTC (T/G) GAACTGGAGCCACCAG-3'

O conjunto de iniciadores externos para preCore tem a seguinte sequência:

externo com sentido: HBPr 69: 5'-bio-ACATAAGAGGACTCTTGGAC-3'

externo anti-sentido: HBPr 8: 5'-bio-GAAGGAAAGAAGTCAGAAGGC-3'

O conjunto de iniciadores externos para HBsAg tem a seguinte sequência:

externo com sentido: HBPr 134: 5'-bio-TGCTGCTATGCCTCATCTTC-3'

externo anti-sentido: HBPr 135: 5'-bio-CA(G/A)AGACAAAAGAAAATTGG-3'.

As amostras que foram negativas no primeiro ciclo de PCR foram novamente testadas numa reacção interna composta pelo seguinte: ? µL de H₂O, 5 µL de tampão Taq 10×, 1 µL de dXTPs 10 mM, 1 µL de cada iniciador interno (10 pmol/µL), 1 µL do produto de PCR do primeiro ciclo, e 2 U de polimerase Taq. O esquema de amplificação foi idêntico ao do primeiro ciclo de PCR. A sequência dos iniciadores internos foi como se segue, para a região preS1:

interno com sentido HBPr 2: 5'-bio-GAACAAGAGCTACAGCATGGG- 3'

interno anti-sentido HBPr 3: 5'-bio-CCACTGCATGGCCTGAGGATG-3';

e para a região preCore:

interno com sentido HBPr 70: 5'-bio-TACTTCAAAGACTGTGTGTTTA-3'

interno anti-sentido HBPr 7: 5'-bio-CTCCACAG (T/A) AGCTCCAAATTC-3'

Numa segunda reacção a região HBsAg pode ser amplificada num protocolo semelhante através da utilização dos seguintes iniciadores: HBPr 75: 5'-bio-CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCC-3' em combinação com HBPr 76: 5'-bio-CCAAACAGTGGGGGAAAGCCC-3'; ou com HBPr 94: 5'-bio-GGTA (A/T) AAAGGGACTCA (C/A) GATG-3'.

Exemplo 2. Preparação dos Ensaios de Sonda em Linha

Foram desenhadas sondas para cobrir os motivos genotípicos e mutantes universais. Em princípio foram mantidas apenas as sondas que discriminam entre uma única variação nucleotídica. No entanto, para certos polimorfismos nas extremidades da sonda, foi tolerada reactividade cruzada. A especificidade foi alcançada experimentalmente para cada sonda individualmente após considerar a % (G+C), o comprimento da sonda, a concentração final e a temperatura de hibridação. As sondas optimizadas foram proporcionadas enzimaticamente com uma cauda poli-T utilizando o TdT (Pharmacia) numa condição reaccional padrão. Resumidamente, foram incubados 400 pmol de sonda a 37°C numa mistura reaccional de 30 µl contendo dTTP 5,3 mM, Tris.HCl 25 mM pH 7,5, cacodilato de sódio 0,1 M, CoCl₂ 1 mM, DTT 0,1 M e 170 U finais de desoxinucleotidil-transferase (Pharmacia). Após uma incubação de uma hora, a reacção foi parada e as sondas feitas à medida foram precipitadas e lavadas com etanol gelado. As sondas foram dissolvidas em SSC 6× nas suas respectivas concentrações específicas e aplicadas como linhas horizontais em tiras de membranas em concentrações entre 0,2 e 2,5 pM/mL. O ADN biotinilado foi aplicado juntamente como controlo positivo (linha 1 de LiPA). Os oligonucleótidos foram fixados na membrana através de cozedura a 80°C durante 12 horas. A membrana foi então cortada em tiras de 4 mm. O desenho desta tira está indicado na Figura 2.

Exemplo 3. Desempenho do teste LiPA

Volumes iguais (10 µL cada) do fragmento de PCR biotinilado e da solução de desnaturação (DS; NaOH 400 mM/EDTA 10 mM) foram misturados em calhas de teste e incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos. Depois, foram adicionados 2 mL da solução de hibridação pré-aquecida a

37°C (HS, SSC 3×/SDS a 0,1%), seguido da adição de uma tira por calha de teste. A hibridação ocorreu durante 1 hora a $50 \pm 0,5^\circ\text{C}$ num banho-maria fechado com agitação. As tiras foram lavadas duas vezes com 2 mL de solução de lavagem rigorosa (SSC 3×/SDS a 0,1%) à temperatura ambiente durante 20 segundos, e uma vez a 50°C durante 30 minutos. Após esta lavagem rigorosa, as tiras foram lavadas duas vezes com 2 mL da Solução de Lavagem padrão de Innogenetics (RS). As tiras foram incubadas numa plataforma giratória com o conjugado de estreptavidina marcado com fosfatase alcalina, diluído em Solução de Conjugado padrão durante 30 minutos à temperatura ambiente (20 a 25°C). As tiras foram então lavadas duas vezes com 2 mL de RS e uma vez com Tampão Substrato padrão (SB), e a reacção colorida foi iniciada através da adição de BCIP e NBT ao SB. Após um máximo de 30 minutos à temperatura ambiente, a reacção de cor foi parada através da substituição dos compostos coloridos por água destilada. Imediatamente após a secagem, as tiras foram interpretadas. As reactividades foram consideradas positivas sempre que a reactividade foi mais forte que a reacção no controlo negativo. As tiras podem ser armazenadas num local seco e escuro. O procedimento completo descrito acima pode também ser substituído pelo dispositivo de automação Inno-LiPA padronizado (auto-LiPA).

Exemplo 4. Selecção do material de referência

Foram preparados fragmentos de PCR, derivados de membros dos diferentes genótipos, das diferentes sequências preCore de tipo selvagem e mutantes, de motivos resistentes a fármacos e de mutantes de escape à vacina. Os fragmentos de PCR foram amplificados com iniciadores sem o grupo biotina na sua extremidade 5' e clonados no local EcoRV pré-tratado do vector pGEMT (Promega). Os clones recombinantes foram seleccionados após análise de α -complementação e de

comprimento dos fragmentos de restrição, e sequenciados com iniciadores plasmídicos. Outros fragmentos biotinilados foram directamente sequenciados com um protocolo de corante-terminador (Applied Biosystems) utilizando os iniciadores de amplificação. Alternativamente, foi realizada PCR interna com análogos dos iniciadores, nos quais o grupo biotina foi substituído com a sequência do iniciador T7 e SP6, respectivamente. Estes amplicões foram então sequenciados com um procedimento de corante-iniciador SP6 e T7. Ao fazê-lo, foi preparado um painel de referência de clones recombinantes, que é necessário para optimização das sondas de LiPA.

Exemplo 5: Genotipagem de amostras de soro infectadas com HBV

Apenas após a criação de um alinhamento de sequências tal como mostrado na Figura 1, se tornou claro quais as regiões que podiam ser úteis para genotipagem de HBV. A região preS1 parece ser adequada devido ao elevado grau de variabilidade. As sondas foram portanto desenhadas para cobrir a maior parte destas regiões variáveis tal como mostrado na Tabela 1. Apenas uma selecção muito limitada de sondas foi mantida devido à sua reacção específica com o painel de referência. As mais importantes estão indicadas como regiões dentro de caixas na Figura 1. Estas sondas seleccionadas foram então aplicadas num formato LiPA indicado na Figura 2, como linha número 2 a 14. Algumas das sondas podem ser aplicadas juntas numa linha, devido ao seu carácter universal, enquanto que outras necessitam de ser aplicadas separadamente. Com a selecção de sondas assim obtidas, foram testadas amostras de soro colhidas em diferentes partes do mundo (Europa, América do Sul, África, Médio Oriente). A parte superior da Figura 3 mostra a reactividade de uma selecção de amostras nestas sondas. A

genotipagem destas amostras é directa, com as amostras 2 a 8 pertencendo ao genótipo A, as amostras 9 e 10 pertencendo ao genótipo B, as amostras 11 e 12 pertencendo ao genótipo C, as amostras 13 a 19 pertencendo ao genótipo D, as amostras 20 a 23 pertencendo ao genótipo E, e a amostra 24 pertencendo ao genótipo F.

A genotipagem pode também ser efectuada na região HBsAg. Novamente, as sondas foram desenhadas para cobrir a maior parte das regiões variáveis mostradas na Fig. 1. Foi mantida apenas uma selecção limitada de sondas. Estas sondas estão numa caixa na Fig. 1 e estão listadas na Figura 4. Foi preparada uma tira de LiPA possuindo estas sondas e foram caracterizadas amostras pertencendo aos diferentes genótipos, tal como mostrado na Fig. 5.

Exemplo 6. Pesquisa da região preCore quanto a mutações

A expressão de HBeAg pode ser regulada ao nível da transcrição e tradução. É postulado que existe regulação da transcrição devido à presença de uma variação dinucleotídica na região promotora do ARNm de preCore. As sondas cobrindo o motivo de tipo selvagem (p.ex., sonda HBPr 88) e o mutante (p.ex., HBPr 89) foram seleccionadas e as suas posições estão indicadas no alinhamento mostrado na Figura 1, e foram aplicadas na tira de LiPA como linha 15 e 16 (Figura 2).

Ao nível da tradução, podem surgir muitas mais mutações, todas resultando possivelmente na abolição da expressão de HBeAg: quaisquer mutações no codão 1 (ATG) destruindo o início da tradução, codão 2 (CAA para TAA), codão 7 (TGC para TGA), codão 12 (TGT para TGA), codão 13 no genótipo B, C, D, E, F (TCA para TGA ou TAA), codão 14 (TGT para TGA), codão 18 (CAA para TAA), codão 21 (AAG para TAG), codão 23

(TGC para TGA), codão 26 (TGG para TAG ou TGA), codão 28 (TGG para TAG ou TGA). No entanto, devido a um constrangimento secundário do sinal de encapsidação, a maioria das mutações ocorre no codão 28 (TGG para TAG). Juntamente com a mutação no codão 28, é frequentemente observada uma segunda mutação no codão 29 (GGC para GAC). No caso do genótipo A e novamente como consequência do constrangimento secundário, mutações de codão de terminação no codão 28 são apenas prováveis de ocorrer após selecção de uma mutação do codão 15 (CCC para CCT). Assim, a interpretação correcta de mutações preCore é dependente do genótipo. Para além dos codões de terminação acima mencionados, uma enorme quantidade de diferentes mutações de deleção ou inserção no enquadramento de leitura aberto de preCore pode dar essencialmente o mesmo resultado.

Para desenvolver um ensaio sensível para detectar as mutações relevantes e as mutações hipotéticas, foi desenvolvido um procedimento de pesquisa de sondas. Sondas parcialmente sobreponíveis foram desenhadas e aplicadas num formato LiPA (Figura 2, linha 17 a 27). Neste formato de ensaio, são positivamente reconhecidas sequências de tipo selvagem ao longo da região preCore completa, juntamente com a variação do codão 15 para o genótipo A versus genótipos não A, e as mutações mais comuns no codão 28 (TAG), no codão 29 (GAC) e na combinação do codão 28 e 29 (TAGGAC). A ausência de reactividade numa das outras sondas é sempre indicadora da presença de uma variação. A natureza exacta desta variação pode então ser revelada através da análise da sequência ou com mais sondas de LiPA desenhadas.

A Figura 3 mostra a reactividade das amostras genotipadas seleccionadas nas sondas para a região preCore. As amostras foram previamente testadas quanto à presença de HBeAg ou

quanto a anti-HBe. A interpretação da reactividade nas sonda de LiPA para cada amostra está indicada por baixo de cada tira. Esta abordagem permitiu a pesquisa simultânea de uma amostra para mutações de preCore e a caracterização do genótipo viral.

A Figura 6 mostra também um painel de amostras com mutações na região preCore, bem como amostras de tipo selvagem. As sondas utilizadas neste ensaio estão listadas na Figura 4. Este ensaio inclui um codão 29 mutante (motivo M4), que não estava presente na experiência na Figura 3.

Exemplo 7. Detecção de mutantes na região HBsAg

Mutantes de escape à vacina foram descritos. O mutante mais vulgarmente verificado é a variação no codão 145 de HBsAg (G145R ou GGA para AGA). As sondas de LiPA são desenhadas para detectar sondas de tipo selvagem e mutantes. Estão presentes variações genotípicas na vizinhança do codão 145. Portanto, o genótipo A é coberto pela sonda 77, o genótipo B pela sonda 78, o genótipo C pela sonda 79, e o genótipo D/E pela sonda 80. Assim, em princípio, é possível genotipar e detectar as estirpes de tipo selvagem do vírus numa única experiência. As sequências alvo mutantes são cobertas pela sonda 81 e 82 para o genótipo A e D, respectivamente. A sonda 83 pode ser utilizada como controlo positivo nestas experiências. Mais detecção de mutantes na região do determinante a é possível por meio de uma abordagem de pesquisa de sondas. Até aqui, as sondas são desenhadas para cobrir a sequência de tipo selvagem dos diferentes genótipos ao longo da região do epitopo de HBsAg e aplicadas num formato de LiPA. Novamente aqui, a ausência de coloração numa destas sondas é indicadora da presença de uma estirpe mutante. A natureza exacta desta variante é então determinada através de análise por sequenciação.

Exemplo 8. Detecção de estirpes de HBV resistentes a lamivudina

Através da analogia com HIV e a resistência contra o composto antiviral 3TC (lamivudina ou $(-)\text{-}\beta\text{-}2',3'\text{-didesoxi-}3'\text{-tiacitidina}$), foi previsto que após tratamento de pacientes infectados com HBV com 3TC, seriam seleccionadas as estirpes virais mostrando resistência no motivo YMDD no gene de pol de HB. O motivo YMDD está fisicamente localizado na região HBsAg, mas é codificado noutra enquadramento de leitura. Assim, esta parte da região de pol de HBV é amplificada com a combinação de iniciadores HBPr 75-HBr 94, mas não com a combinação HBPr 75-HBr 76. As sondas cobrindo o motivo YMDD de tipo selvagem e o motivo mutante YVDD estão indicadas na Figura 1, respectivamente as sondas 95 a 100 e 101 a 103, bem como as sondas 115, 116, 127 e 132, produzindo as últimas sondas os melhores resultados no ensaio de LiPA. Um tal ensaio foi utilizado para determinar a presença de mutações no motivo YMDD no soro de um paciente infectado com HBV durante o tratamento com lamivudina. A Fig. 7 mostra que na primeira fase do tratamento (Maio de 1995) não foram detectadas mutações. Durante o tratamento, a carga viral diminuiu, alcançando um nível de aproximadamente 10^4 durante Novembro e Dezembro de 1995, sendo a partir daqui observado um aumento, resultando num nível tão elevado como durante os primeiros meses do tratamento em Junho de 1996. Interessantemente, um ensaio de LiPA efectuado em Fevereiro de 1996 indicou que a maioria do vírus presente, possuía uma mutação no motivo YMDD, que tinha mudado para YVDD. Em Junho de 1996, já não se detectou motivo de tipo selvagem, mas apenas o YVDD mutante. Com este ensaio, estirpes de HBV resistentes podem ser assim facilmente detectadas. Além disso, a detecção combinada do motivo YMDD e dos mutantes de preCore podem

ser clinicamente importantes na previsão e prognóstico de mais tratamento.

REFERÊNCIAS

Asseline U., Delarue M., Lancelot., Toulme F., Thuong, N. "Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity: intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(11): 3297-301, 1984.

Barany F. "Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189-193, 1991.

Bej, A., Mahbubani, M, Miller, R., Di Cesare, J., Half, L., "Atlas R. "Mutiplex PCR amplification and imobilizadas capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water". *Mol. Cell. Probes* 4: 353-365, 1990.

Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., et al. "Rapid and simple method for purification of nucleic acids". *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503, 1990.

Carman, W., Zanetti, A., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo G., Tanzi, E., Zuckerman, A., e Thomas, H. "Vaccine induced escape mutantes". *Lancet* 336: 325-329, 1990.

Carman, W., Korula, J., Wallace, L., MacPhee, R., Mimms, L., e Decker, R. "Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutante that escaped detection by monoclonal HBsAG ELISA". *Lancet* 345: 1406-1407, 1995.

Compton, J. "Nucleic acid sequence-based amplification". *Nature* 350: 91-92, 1991.

Crawford, D. "Hepatitis B virus "escape" mutants: A rare event which causes vaccination failure". *British Med. J.* 301: 1058-1059, 1990.

Duck, P. "Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides". *Biotechniques* 9: 142-147, 1990.

Gao, Q., Gu, Z., Parniak, M., Cameron, I., Cammack, N., Boucher, C., e Wainberg, M. "The same mutation that encodes low-level human immunodeficiency virus type-1 resistance to 2',3'-dideoxyinosine e 2',3'-dideoxycytidine confers high level resistance to the (-) enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine". *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1390-1392, 1993.

Guatelli, J., Whitfield, K., Kwoh, D., Barringer, K., Richman, D., Gengeras, T. "Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878, 1990.

Hadziyannis, S. "Hepatitis B and antigen negative chronic hepatitis B: from clinical recognition to pathogenesis and treatment". *Viral Hepatite* 1: 7-36, 1995.

Honkoop, P., de Man, R., Zondervan, P., Niesters, H., e Schalm, S. "Histological improvement in patients with chronic hepatitis B virus infection treated with lavimudine is associated with a decrease in HBV-DNA by PCR". *Hepatol.* 22: resumo 887, 1995.

Kwoh, D., Davis, G., Whitfield, K., Chappelle, H., Dimichele, L., Gingeras, T. "Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-1177, 1989.

Kwok, S., Kellogg, D., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sinisky, J. "Effects of primer-template mismatches on the polimerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies". *Nucl. Acids Res.* 18: 999, 1990.

Landgren, U., Kaiser, R., Sanders, J., Hood, L. "A ligase-mediated gene detection technique". *Science* 241: 1077-1080, 1988.

Li, J-S., Tong, S-P., Wen, Y-M., Vivitski, L., Zhang, Q., e Trépo, C. "Hepatitis B virus genótipo A rarely circulates as an Hbe-minus mutante: possível contribution of a single nucleotide in the preCore region". *J. Virol.* 67: 5402-5410, 1993.

Ling, R., Mutimer, D., Ahmed, M., Boxall, E.H., Elias, E., Dusheiko, G.M. e Harrison, T.J. "Selection of mutations in the Hepatitis B Virus polimerase during therapy of transplant recipients with lamivudine". *Hepatology* 24: 711-713, 1996.

Lok, A., Akarca, U., e Greene, S. "Mutations in the preCore region of Hepatitis B virus serve to enhance of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4077-4081, 1994.

Lomeli, H., Tyagi, S., Printchard, C., Lisardi, P., Kramer, F. "Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes". *Clin. Chem.* 35: 1826-1831, 1989.

Magnius, L., e Norder, H. "Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the Hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene". *Intervirology* 38: 24-34, 1995.

Matsukura, M., Shinozuka, K., Zon, G., Mitsuya, H., Reitz, M., Cohen, J., Broder, S. (1987) "Fosforothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(21): 7706-10.

Miller, P., Yano, J., Yano, E., Carroll, C., Jayaram, K., Ts'o P "Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylfosfonates". *Biochemistry* 18(23): 5134-43, 1979.

Naoumov, N., Perillo, R., Chokshi, S., Dienstag, J., Vicary, C., Brown, N., e Williams, R. "Reduction in Hepatitis B virus quasispecies during lamivudine treatment is associated with enhanced virus replication and hepatocytolysis". *Hepatol.* 22: resumo 885, 1995.

Nielsen, P., Egholm, M., Berg, R., Buchardt, O. "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". *Science* 254(5037): 1497-500, 1991.

Nielsen, P., Egholm, M., Berg, R., Buchardt, O. "Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA". *Nucleic Acids Res.* 21(2): 197-200, 1993.

Okamoto, H., Yotsumoto, S., Akahane, Y., Yamanaka, T., Miyazaki, Y., Sugai, Y., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., e Mayumi, M. "Hepatitis B virus with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against an antigen". *J. Virol.* 64: 1298-1303, 1990.

Saiki, R., Walsh, P., Levenson, C., Erlich, H. "Genetic analysis of amplified DNA with imobilizadas sequence-specific sondas oligonucleotídicas" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230-6234, 1989.

Sato, S., Suzuki, K., Akahane, Y., Akamatsu, K., Akiyama, K., Yunomura, K., Tsuda, F., Tanaka, T., Okamoto, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M. "Hepatitis B virus strains with mutations in the core promotor in patients with fulminant hepatitis". *Ann. Intern. Medicine* 122: 241-248, 1995.

Shaw, T., Mok, S.S., Locarnini, S.A. "Inhibition of hepatitis B virus DNA polimerase by enantiomers of penciclovir triphosphate and metabolic basis for selective inhibition of HBV replication by penciclovir". *Hepatology* 24: 996-1002, 1996.

Stuyver, L., Rossau, R., Wyseur, A., et al. "Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay". *J. Gen. Virol.* 74: 1093-1102, 1993.

Takahashi, K., Aoyama, K., Onhno, N., Iwata, K., Akahane, Y., Baba, K., Yoshizawa, H., e Mishiro, S. "The precore/core promotor mutante (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection". *J. Gen. Virol.* 76: 3159-3164, 1995.

Tipples, G.A., Ma, M.M., Fischer, K.P., Bain, V.G., Kneteman, N.M. e Tyrell, D.L.J. "Mutation in HBV RNA-dependent DNA polimerase confers resistance to lamivudina *in vivo*". *Hepatology* 24: 714-717, 1996.

Waters, J., Kennedy, M., Voet, P., Hauser, P., Petre, J., Carman, W., e Thomas, H. "Loss of the common "a" determinant of hepatitis B surface antigen by vaccine-induced escape mutantes". *J. Clin. Invest.* 90: 2543-2547, 1992.

Wu, D., Wallace, B. "The ligation amplification reaction (LAR) - amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation". *Genomics* 4: 560-569, 1989.

Yuan, T., Faruqi, A., Shih, J., e Shih, C. "The mechanism of natural occurrence of two closely linked HBV precore predominant mutations". *Virology* 211: 144-156, 1995.

Zhang, X., Zoulim, F., Habersetzer, F., Xiong, S., e Trépo, C. "Analysis of hepatitis B virus genotypes and preCore region variability during interferon treatment of Hbe antigen negative chronic hepatitis B". *J. Med. Virology* xxx-xxx, 1996.

Lisboa, 17 de Janeiro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a detecção de genótipos das estirpes de HBV e de mutantes de HBV resistentes a fármacos numa amostra biológica, compreendendo:

(i) se necessário for, libertação, isolamento ou concentração dos ácidos polinucleicos presentes na referida amostra;

(ii) se necessário for amplificação da parte relevante de um gene de HBV adequado presente na referida amostra com pelo menos um par de iniciadores adequado;

(iii) hibridação dos ácidos polinucleicos do passo (i) ou (ii) com uma combinação de pelo menos uma sonda de cada um dos seguintes grupos:

- SEQ ID 77, 81, 139-141, 190-194
- SEQ ID 78, 142-147, 149
- SEQ ID 79, 150-161, 204
- SEQ ID 82, 162-169, 208
- SEQ ID 170-176, 213
- SEQ ID 178-189, 214-219,
- opcionalmente um ou mais de SEQ ID 80, 148 e 177, e pelo menos uma sonda de cada um dos seguintes grupos:
 - SEQ ID 114, 115, 127-129, 227-234, 243, 249, 250, 261
 - SEQ ID 116, 117, 130-133, 244-248, 251-260, 262-266, e/ou pelo menos um sonda de:
 - SEQ ID 267 e 269, cada uma juntamente com SEQ ID 268,

(iv) detecção dos híbridos formados no passo (iii);

- (v) inferência dos genótipos de HBV e dos mutantes de HBV resistentes a fármacos presentes na referida amostra a partir do sinal ou sinais de hibridação diferencial obtidos nos passo (iv)
2. Método de acordo com a reivindicação 1 em que as sondas oligonucleotídicas do passo (iii) são **caracterizadas por** detectarem especificamente mutações de resistência a fármacos no motivo YMDD, sendo as referidas sondas
- SEQ ID 77, 140 e 193,
 - SEQ ID 78,
 - SEQ ID 153, 154 e 204,
 - SEQ ID 165 e 208,
 - SEQ ID 172 e 213,
 - SEQ ID 186, 216 e 219,
 - SEQ ID 80 e 177,
 - SEQ ID 115 e 127,
 - SEQ ID 116 e 132.
3. Estojo de ensaio para a detecção de genótipos das estirpes de HBV e de mutantes de HBV resistentes a fármacos presentes numa amostra biológica de acordo com o método da reivindicação 1, compreendendo os seguintes componentes:
- (i) quando apropriado, um meio de libertação, isolamento ou concentração dos ácidos polinucleicos presentes na referida amostra;
 - (ii) quando apropriado, pelo menos um par de iniciadores adequado;
 - (iii) pelo menos uma sonda de cada um dos seguintes grupos:
 - SEQ ID 77, 81, 139-141, 190-194
 - SEQ ID 78, 142-147, 149
 - SEQ ID 79, 150-161, 204

- SEQ ID 82, 162-169, 208
- SEQ ID 170-176, 213
- SEQ ID 178-189, 214-219,
- opcionalmente um ou mais de SEQ ID 80, 148 e 177, e pelo menos uma sonda de cada um dos seguintes grupos:
- SEQ ID 114, 115, 127-129, 227-234, 243, 249, 250, 261
- SEQ ID 116, 117, 130-133, 244-248, 251-260, 262-266, e/ou pelo menos um sonda de:
- SEQ ID 267 e 269, cada uma juntamente com SEQ ID 268, possivelmente fixada num suporte sólido;

(iv) um tampão de hibridação, ou os componentes necessários para a produção do referido tampão;

(v) uma solução de lavagem, ou os componentes necessários para a produção da referida solução;

(vi) quando apropriado, um meio para detecção dos híbridos resultantes da hibridação anterior;

(vii) quando apropriado, um meio para ligar a referida sonda a uma localização conhecida num suporte sólido.

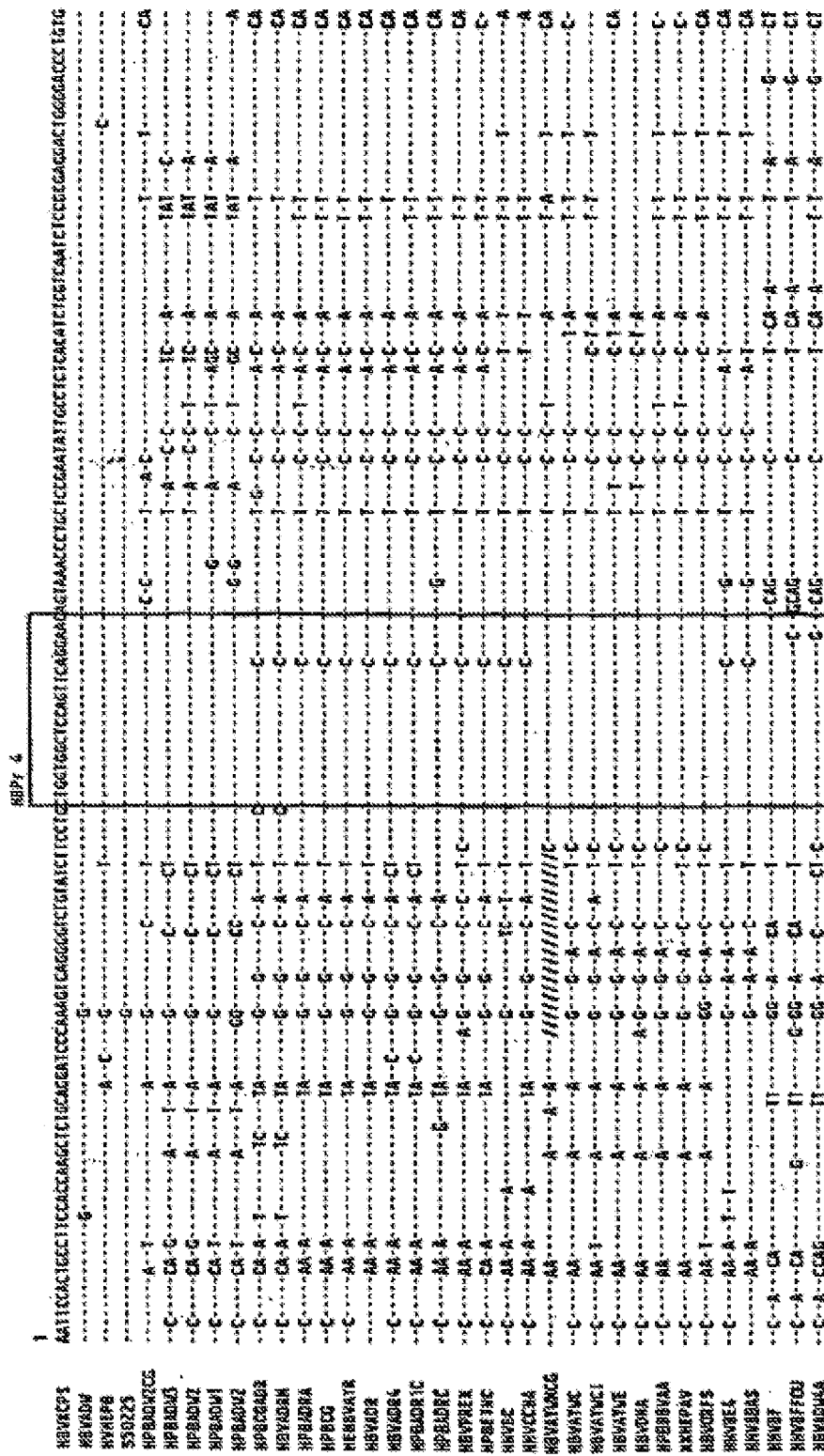
4. Um mutante de HBV compreendendo a sequência nucleotídica contendo a mutação resistente a fármacos no gene de RT-pol de HBV, em que a mutação resulta numa mudança de aminoácidos no motivo YMDD da polimerase de HBV em que a referida mudança de aminoácidos é de M para V na posição 552 tal como indicado na figura 1.

5. Método para identificação de um mutante de HBV tal como definido na reivindicação 4 numa amostra, compreendendo:

(i) libertação, isolamento ou concentração dos ácidos polinucleicos presentes na referida amostra;

- (ii) opcionalmente, amplificação de pelo menos a parte do gene de HBV presente na referida amostra com pelo menos um par de iniciadores;
- (iii) determinação da presença ou ausência de uma mutação no gene de RT-pol de HBV resultante numa mudança de aminoácidos no motivo YMDD da polimerase de HBV em que a referida mudança de aminoácidos é de M para V na posição 552 tal como indicado na figura 1, e deste modo identificar a existência de uma estirpe de HBV resistente a fármacos na referida amostra.

Lisboa, 17 de Janeiro de 2011



4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525
 526
 527
 5

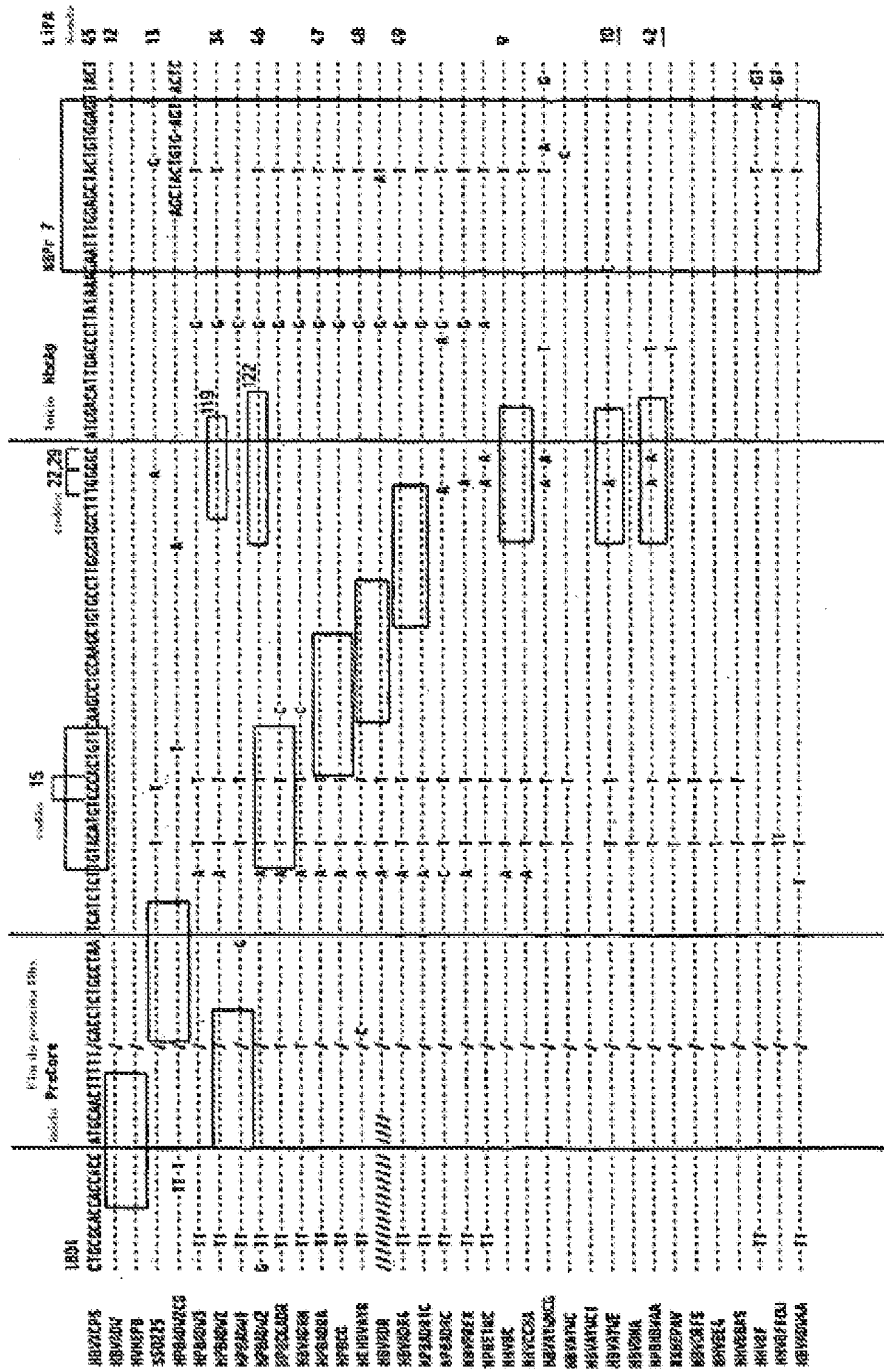
[illegible]

18PA
Sonda

	HBPr 69	HBPr 70	promotor de Represe	promotor de Core
HBVCP5	CTTACATAGAGGACTCTTGGAC	CTTCAGCAATGTCAACGACCGACTTGAGGCC	ACTTCAAAGACTGTGTGTTAGGACTGGGACGACCTGGGACGACATAGCTTACGAGCTTTGTATAGGAGGCTGAGGCAATATATGGT	
HBVADN	C	C	C	C
HBVNEP8	C	C	C	C
SS0225	A	C	T-A	T-A
HBADUJCG			A	A
HBADUJ3			T-G	C
HBADUJZ			C	C
HBADUJ1			T-G	C
HBADUJ2			T-G	C
HBCCGADR			T-G	C
HBVADRN			A	C
HBADORA			A	C
HBBCG			A	C
HBVATYR			A	C
HBVADR			A	C
HBVADR4			A	C
HBVADR1C			A	C
HBVADR1C			A	C
HBVPREX			A	C
HBVETNC			A	C
HBVBC			A	C
HBVCCNA			A	C
HBVATWCG			A	C
HBVATWC			A	C
HBVATWC1			A	C
HBVATYR			A	C
HBVORA			A	C
HBVHBVAA			A	C
HBVHBVAV			A	C
HBVHBVFS			A	C
HBVBE4			A	C
HBVBBAS			A	C
HBVBF			A	C
HBVBF0J			A	C
HBVADW4A			A	C

89

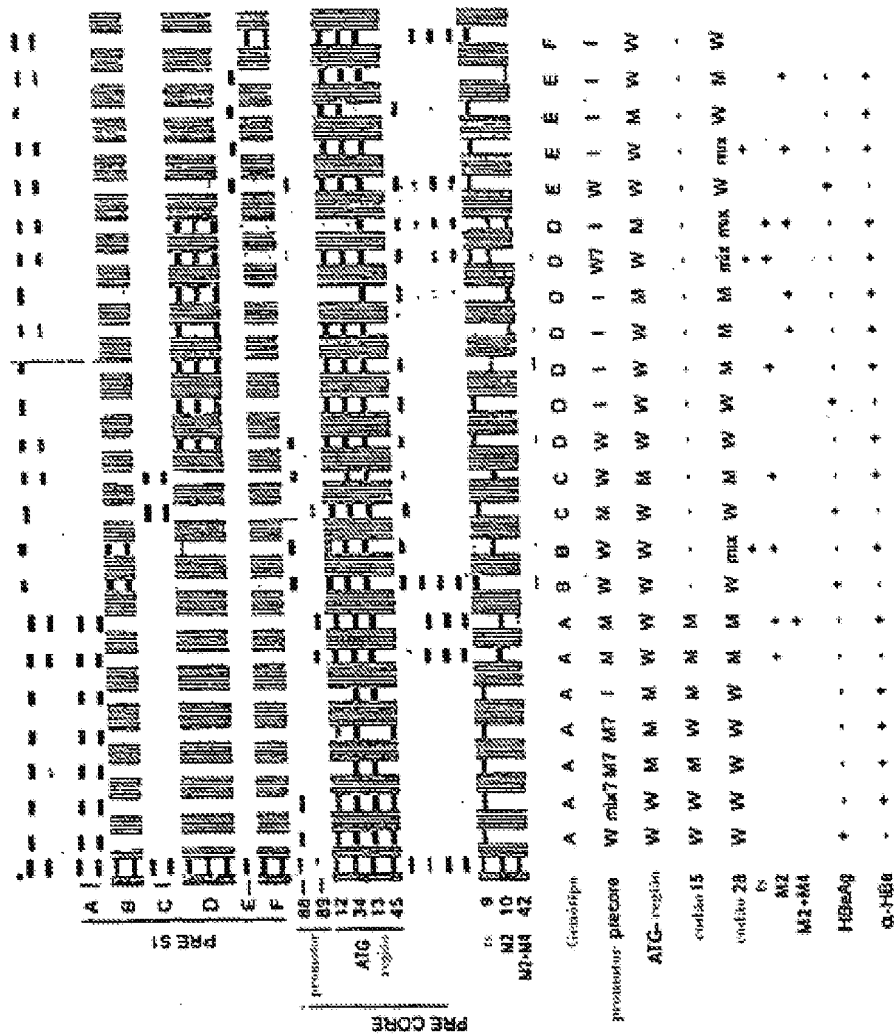
88



[illegible]

Descrição de LPA do RRV			HSP	
Linha LPA	Região	Objetivo	Número da sonda / SEQ ID NO	sequência
0		Linha do bônus		
1		ADN biotilizada		
2	PreS1	ampl. contr.	33	CTGAGGGCTCCACCCCA
3	PreS1	Genótipo A	22	AACCTCGCAAAGGCAT
4	PreS1	Genótipo A	50	CCCAGAGGGTTGGGAAC
	PreS1	Genótipo A	15	GCCAGCAGCCCAACCAG
5	PreS1	Genótipo B	57	CTGCATTCAAAGCCAACT
	PreS1	Genótipo B	58	CCCCATGGGGGACTGTTG
6	PreS1	Genótipo B	59	CATACTCACAACCTGTGCCA
7	PreS1	Genótipo C	55	TTCAACCCCAACAAGGATC
8	PreS1	Genótipo C	54	TCAGGAAGACAGCCTAC
9	PreS1	Genótipo D	92	TTCTGCCCATGCTGTA
10	PreS1	Genótipo D	56	AATGCTCCAGCTCCTAC
11	PreS1	Genótipo D	73	TTCCACCAGCAATCCTC
12	PreS1	Genótipo E	60	GGGCTTTCTTGGACGGTCC
	PreS1	Genótipo E	61	CTCTCGAATGGGGGAAGA
	PreS1	Genótipo E	62	CCTACCCCAATCACTCCA
13	PreS1	Genótipo F	63	AGCACCTCTCTCAAGGACA
14	PreS1	Genótipo F	64	GCAAATTCAGCAGTCCCG
	PreS1	Genótipo F	65	GCCAATGGCAAACAAGGTA
15	preCore	promotor	88	TAGGTTAAAGGTCTTTGT
16	preCore	promotor	89	TAGGTTAATGATCTTTGT
17	preCore	codão pesq -2 to +3	12	AAGTTGCATGGTGCTG
18	preCore	codão pesq 1 to 5	34	ATGCAACTTTTTCACC
19	preCore	codão pesq 5 a 9	13	CACCTCTGCCTAATCAT
20	preCore	codão pesq 12 a 17	45	TGTACATGTCCCACTGTT
21	preCore	codão pesq 12 a 17	46	TGTTCAATGTCTACTGTT
22	preCore	codão pesq 16 a 20	47	ACTGTTCAAGCCTCCAAG
23	preCore	codão pesq 19 a 23	48	GGCACAGCTTGGAGGCTT
24	preCore	codão pesq 23 a 27	49	AAAGCCACCCAAGGCACA
25	preCore	codão 28 to	9	TGGCTTTGGGGCATGG
26	preCore	codão 28 ml	10	TGGCTTTAGGGCATGG
27	preCore	codão 28+29 ml	42	TGGCTTTAGGACATGGA

Fig. 2



1. *Environ. Biol. Fish.* 2000, 58: 161-170.

Genotipagem em HBsAg

Genótipo	Oligo	Sequência
A	HBPt 193	GGA TCA ACA ACA ACC AGT
	HBPt 140	CT CAA GGC AAC TCT ATG GG
	HBPt 77	CTA CGG ATG GAA ATT GC
B	HBPt 78	TAC GGA CGG AAA CTG C
C	HBPt 153	CT CTA CTT CCA GGA ACA G
	HBPt 154	C TGC ACG ATT CCT GCT
	HBPt 204	CT TTC GCA AGA TTC CTA TGG G
D	HBPt 185	AC TCT ATG TAT CCC TCC T
	HBPt 208	GC TGT ACC AAA CCT TCG GAT
E	HBPt 172	G GGA CCC TGC CGA AC
F	HBPt 213	AG TGG TTC GCC GGG CTG G
	HBPt 216	CA GGA TCC ACG ACC ACC AGG
	HBPt 219	GC TGT TCC AAA CCC TCG GAG
A/B	HBPt 188	G CCA AAT CTG TGC AGC
	HBPt 148	CT TTC GCA AAA TAC CTA TG
	HBPt 80	CTT CGG ACG GAA ATT GC
C/D/E	HBPt 177	ATG TTG CTG TTC AAA ACC TG

Resistência a fármaco no gene de RT pol

Genótipo	Oligo	Sequência	
A	HBPt 115	TCA GCT ATA TGG ATG ATG	tipo selvagem
	HBPt 116	TTC AGC TAT GTG GAT GAT	mutante
D	HBPt 127	TC AGT TAT ATG GAT GAT G	tipo selvagem
	HBPt 132	T TTC AGT TAT GTG GAT GAT	mutante

Região PreCore

Genótipo	Oligo	Sequência	
	HBPt 88	TAG GTT AAA GGT CTT TGT	promotor tipo selvagem
	HBPt 89	TAG GTT AAT GAT CTT TGT	promotor mutante
	HBPt 119	TGG CTT TGG GGC ATG	codão 28 tipo selvagem
	HBPt 10	TGG CTT TAG GGC ATG G	codão 28 do M2 mutante
	HBPt 122	TGG CTT TGG GAC ATG G	codão 29 do M4 mutante
	HBPt 42	TGG CTT TAG GAC ATG GA	codão de 28 e 29 do M2/M4 mutantes

Fig. 4

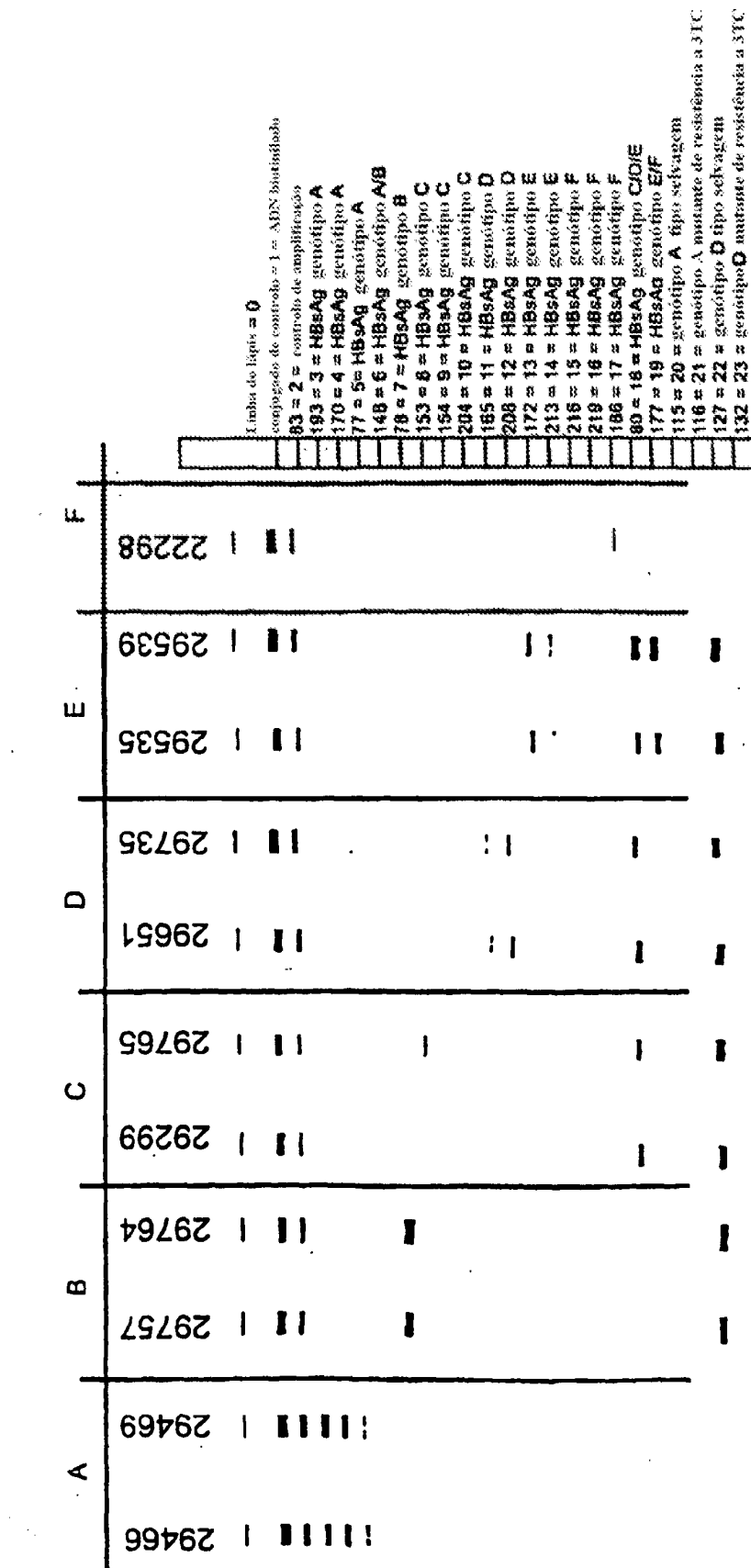


Fig. 5

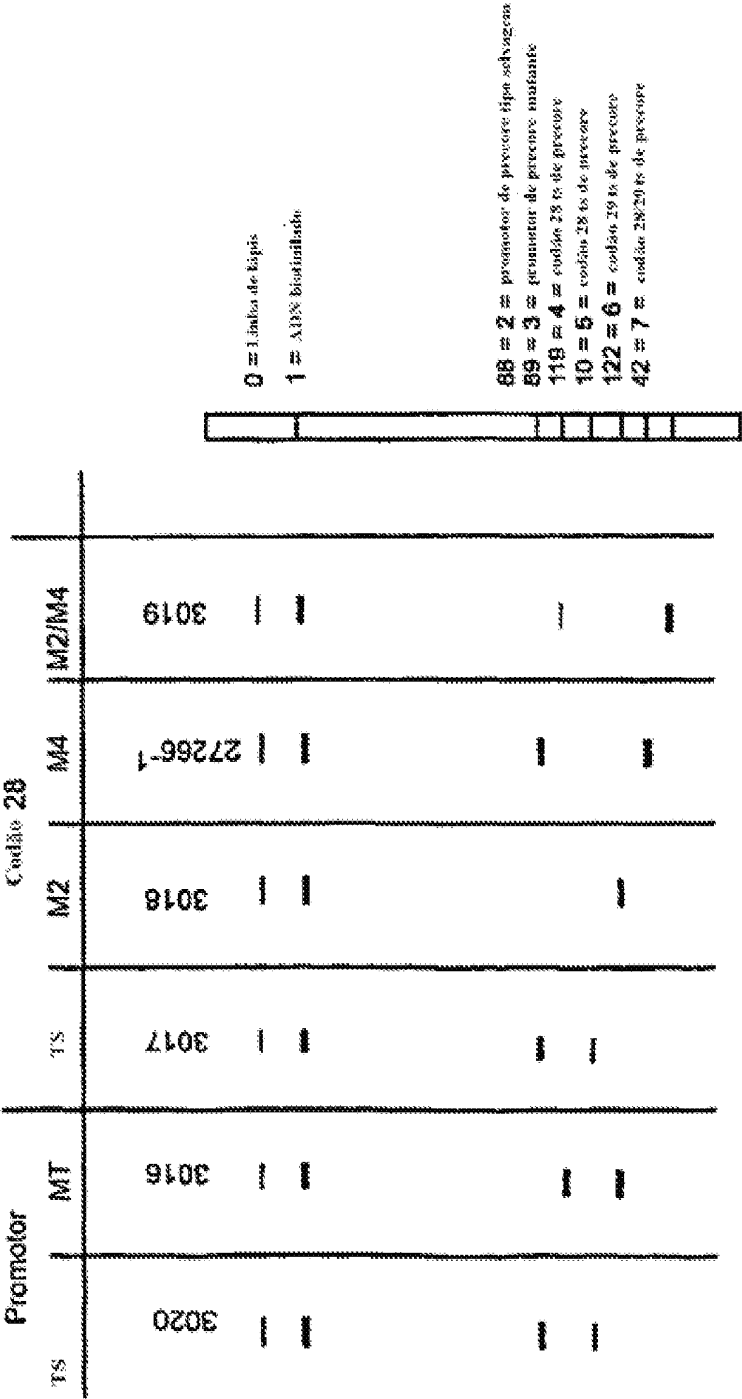


Fig. 6

Paciente infectado com HBV tratado com lamivudina

Fig. 7

