

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO
No 94 001

NOME: XYTRONYX, INC.

EPÍGRAFE: "Processo de detecção da presença de uma infecção por Pneumocystis carinii, de preparação de polinucleótidos e de composições contendo polinucleótidos"

INVENTORES: Peter Baram, Kary Banks Mullis

Reivindicação do direito de prioridade (ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883):

Estados Unidos da América em 11 de Maio de 1989 sob o nº.
07/350,937

71 001
XYT0033P

PATENTE Nº. 94 001

"Processo de detecção da presença de uma infecção por Pneumocystis carinii, de preparação de polinucleótidos e de composições contendo polinucleótidos"

para que

XYTRONYX, INC., pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de detecção da presença de uma infecção por Pneumocystis carinii num mamífero, caracterizado por compreender:

(a) misturar uma amostra de fluido vascular desnaturado, do referido mamífero, com uma sonda polinucleotídica de Pneumocystis carinii, capaz de se hibridar com o ADN genómico de Pneumocystis carinii ou com um seu transcrito de ARN,

(b) manter a referida mistura sob condições de hibridação, durante um período de tempo suficiente para que a referida sonda se hibridize com qualquer sequência de ácido nucleico complementar presente na referida amostra, de modo a formar um duplex hibridado, e

(c) detectar a presença de qualquer duplex formado no passo (b) e, por este meio, a presença de infecção por Pneumocystis carinii no referido mamífero.

O invento refere-se ainda ao processo de preparação de polinucleótidos bem como de composições contendo os referidos nucleótidos.

MEMÓRIA DESCRITIVA

Campo Técnico

O presente invento descreve processos e sistemas para detectar a presença de uma infecção clínica por Pneumocytis carinii, por hibridação dos ácidos nucleicos usando segmentos de polinucleótidos específicos de P. carinii.

Antecedentes

A pneumonia pela Pneumocytis carinii (P. carinii) é a infecção oportunista mais frequente na SIDA e tem uma significativa morbidez e mortalidade na SIDA e em outros pacientes imunocomprometidos. Em pacientes imunossuprimidos, tais como os receptores de órgãos de transplante, a infecção causada pela P. carinii constitui um problema adicional importante. São, portanto, necessários processos para detectar a P. carinii nos primeiros estádios da infecção, para permitirem o diagnóstico efectivo e o tratamento.

Os processos actuais para detectar a pneumonia pela P. carinii dependem da biópsia do pulmão de um paciente, com exame do tecido para indícios de sintomas patogénios ou de doença. Têm sido descritos processos de imunodiagnóstico usando anticorpos que imunorreagem com antigénios da P. carinii para detectar a presença de antigénios na expectoração e nas amostras aspiradas na traqueia. Ver Lim, Patente E.U.A., Nº. 3 992 516.

Têm sido largamente difundidas as tentativas de serodiagnose da P. carinii para detectar quer os antigénios da P. carinii no soro, quer os anticorpos para esses antigénios, quer de ambos. Ver Hughes, pág. 35-48, em Pneumocystis Carinii Pneumonitis, CRC Press, Boca Raton, FL, Vol II, 1987.

A detecção de títulos de anticorpos contra a P. carinii tem-se, contudo, caracterizado por não ser de confiança no diagnóstico da pneumonia já que a maioria dos indivíduos normais têm títulos substanciais. Pifer, Chest, 87:698-700, 1985. Os ensaios de avaliação de antigénios da P. carinii no sangue (antigenemia) têm, também, sido criticados quanto ao seu grau de confiança no

diagnóstico da pneumonia. Hughes, Chest, 87:700, 1985.

A doença provocada pela P. carinii é quase sempre limitada aos pulmões. No passado, o diagnóstico definitivo da infecção dependia da demonstração da existência de organismos no tecido do pulmão ou num aspirado dos pulmões ou do tracto respiratório. Têm-se detectado organismos, nalguns casos, em esfregaços da faringe, em aspirados da traqueia e expectoração, nos aspirados gástricos e nas lavagens broncopulmonares e, em casos raros, na medula óssea. Contudo, à parte a precária detecção dos antigénios da P. carinii ou dos anticorpos anti-P. carinii acima descrita, não tem havido relatos sobre organismos da P. carinii ou de outros materiais associados presentes no sangue dum paciente infectado.

Está, presentemente, disponível uma escassa informação sobre a sequência de ácidos nucleicos da P. carinii. O ARN ribossómico (rARN) foi clonado a partir dos trofozoitos da P. carinii da ratazana e foi sequenciado. Edman et al., Nature, 334:519-522, (1988). Foram usados in situ, polinucleótidos do rARN da P. carinii, tendo a menor sequência de identidade com rARNs de tipo 16S conhecido, para hibridar com tecido de pulmão infectado com P. carinii. Preparou-se ADN recombinante portador de segmentos de ADN genómico de P. carinii, a partir de cistos de P. carinii de pulmão de ratazana e usou-se, também, como sonda por hibridação de mancha de 'southern', para detectar ADN genómico de P. carinii em tecidos de pulmão infectados, de ratazana e do homem. Ver Tanabe et al., J. Inf. Diseases, 157:593-596 (1988).

Breve Sumário do Invento

Descobriu-se agora que mamíferos portadores de uma infecção clínica de P. carinii têm, no seu sangue, ácidos nucleicos específicos de P. carinii, detectáveis.

O presente invento inclui, portanto, um processo para detectar uma infecção clínica pela P. carinii num mamífero, compreendendo a formação de uma mistura de reacção de hibridação, obtida por mistura de uma amostra de fluido vascular desnaturado do referido mamífero com uma sonda de polinucleótido específico

da P. carinii capaz de hibridar com o ADN genómico da P. carinii ou com o seu ARN transcrito. A mistura é mantida em condições de hibridação durante um período de tempo suficiente para que a referida sonda hibride com qualquer sequência complementar de ácido nucleico presente na referida amostra, para formar um duplex híbrido. A presença de qualquer duplex formado no passo (b) é então detectada, daí resultando a detecção da presença de infecção pela Pneumocystis carinii no referido mamífero.

Em concretizações preferidas do invento a sonda de polinucleótido tem uma sequência de nucleótidos que é complementar de uma porção específica de Pneumocystis carinii da sequência de nucleótidos do ARN ribossómico da Pneumocystis carinii.

Na medida em que a reacção em cadeia da polimerase (PCR) é um processo eficaz para aumentar a sensibilidade da detecção de um duplex de ácido nucleico, prefere-se ainda que o processo detecte um produto de ácido nucleico amplificado produzido por PCR.

Noutras concretizações preferidas, o duplex híbrido é um duplex ARN-ADN que se detecta preparando, primeiro, uma molécula cADN a partir do duplex ARN-ADN e amplificando, depois, o cADN usando uma reacção em cadeia de polimerase.

Descrição Detalhada do Invento

A. Definições

Nucleótido: unidade monómera de ADN ou ARN que consiste numa porção açúcar (pentose), num fosfato e numa base heterocíclica azotada. A base está ligada à porção açúcar por meio do carbono glicosídico (carbono 1' da pentose) e essa combinação de base e açúcar é um nucleósido. Quando o nucleósido contém um grupo fosfato ligado à posição 3' ou 5' da pentose é chamado nucleótido. Uma sequência de nucleótidos ligados operativamente, é tipicamente, aqui referida como uma "sequência de bases" ou "sequência de nucleótidos" e é aqui representada por uma fórmula na qual a orientação da esquerda para a direita é a direcção convencional do terminal 5' para o terminal 3'.

Polinucleótido: molécula de ácido nucleico que compreende uma unidade polimera de ADN ou ARN com uma sequência de dois ou mais nucleótidos ligados operativamente que formam uma cadeia linear simples de nucleótidos, também referida como um oligonucleótido.

Duplex de ADN: molécula em duas cadeias de ácido nucleico que consiste em duas cadeias de polionucleótidos complementares hibridadas juntas pela formação de uma ligação hidrogénio entre cada um dos nucleótidos complementares presentes num par de bases do duplex. Porque os nucleótidos que formam o par de bases podem ser quer uma base de ribonucleótidos quer uma base de deoxirribonucleótidos, a expressão "duplex de ADN" refere-se quer a um duplex ADN-ADN, compreendendo duas cadeias de ADN, quer a um duplex ARN-ADN, compreendendo uma cadeia de ADN e uma cadeia de ARN.

Par de Bases (bp): associação de adenina (A) com timina (T), ou de citosina (C) com guanina (G) num duplex de duas cadeias de ADN.

Ácido Nucleico: termo que se refere a qualquer das classes de moléculas que incluem ácido ribonucleico (ARN), ácido deoxinucleico (ADN) nas suas formas de cadeia simples ou dupla, e polinucleótidos.

B. Processo para Detectar Infecções pela P. carinii

A expressão "infecção clínica" aqui usada refere-se à presença de sintomas detectáveis clinicamente como a dispneia, febre, tosse, cianose e infiltrado bilateral difuso, devidos à presença de um elevado número de organismos P. carinii sobre ou dentro dos pulmões de indivíduos. Ver Pneumocystis carinii Pneumonitis, Capítulos 7, 8 e 10, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1987, para uma descrição detalhada da evidência clínica e histológica de doenças induzidas pela P. carinii. Em contraste, "infecção latente" é aqui usada para referir uma infecção subclínica pela P. carinii, i.e., a presença de um baixo número de organismos e nenhuma evidência clínica ou histológica significativa de doença.

O presente invento refere-se a um processo para determinar a presença de uma infecção clínica pela P. carinii num mamífero, pela determinação da presença de ácidos nucleicos codificados de P. carinii numa amostra de fluido vascular como o sangue, soro, plasma e semelhantes. Tipicamente o processo realiza-se submetendo a amostra a uma reacção de hibridação com uma sonda de polinucleótido específica de P. carinii, determinando depois, a presença de qualquer produto formado pela reacção de hibridação, indicando a presença do produto, a presença de uma infecção pela P. carinii.

1. Amostra Desnaturada de Sangue

Na prática do presente invento é vantajoso tratar, primeiro, a amostra de fluido vascular, de preferência soro ou plasma, a ser ensaiada, com um agente desnaturante que dissocie complexos de ácidos nucleicos/proteínas, dando, assim, acesso aos ácidos nucleicos a hibridar. Agentes desnaturantes úteis incluem os solventes orgânicos, os sais caotróficos, os surfactantes e semelhantes. São exemplos de solventes orgânicos a acetona, o álcool, misturas acetona/álcool e semelhantes. São exemplos de sais caotróficos o iodeto de sódio, o cloreto de guanidínio, o isotiocianato de guanidínio e semelhantes. São exemplos de surfactantes os materiais aniónicos e não-iónicos. Exemplos ilustrativos de surfactantes aniónicos incluem o dodecilsulfato de sódio (SDS), laurilsulfato de amónio (ALS), laurilsulfato de potássio, miristilsulfato de sódio e semelhantes.

De preferência, a amostra de fluido vascular é tratada com acetona, misturando cerca de 5 até cerca de 100 volumes de acetona com 1 volume de amostra. A mistura acetona/amostra é então mantida a 100°C durante um período de tempo suficiente para evaporar a acetona e a água presente formando-se, assim, uma amostra seca, desnaturada. Os ácidos nucleicos presentes na amostra seca são solubilizados por mistura com um solvente aquoso, de preferência água estéril isenta de RNase.

A seguir à desnaturação, os ácidos nucleicos presentes na amostra podem, ainda, ser isolados de material proteínico

presente na amostra, por métodos bem conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Maniatis et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 458 (1982).

Tipicamente, o processo usado para isolar os ácidos nucleicos dependerá, como é bem conhecido na arte, do tipo de ácido nucleico, i.e., ARN ou ADN, a ser detectado.

2. Sondas de Polinucleótidos

A amostra desnaturada de fluido vascular é então sondada por hibridação com uma sonda de polinucleótido específica da P. carinii. As sondas de polinucleótido (segmentos) são polinucleótidos com cerca de 10 a 500 bases de nucleótidos de comprimento, de preferência de 15 a 25 nucleótidos de comprimento, com uma sequência de bases de nucleótidos que é substancialmente complementar com os transcritos de ADN genómico da P. carinii ou do ARN da P. carinii.

Por "substancialmente complementar" e seus equivalentes gramaticais, deve entender-se que há suficiente similaridade da sequência de bases de nucleótidos entre a sonda de polinucleótido em causa e uma sequência de ácidos nucleico que tenha complementaridade exacta com a sequência de ácido nucleico da P. carinii tal que o polinucleótido em causa seja capaz de hibridar com o ácido nucleico específico da P. carinii, em condições de hibridação. A sonda de polinucleótido não precisa, portanto, de conter a sequência exacta que seja complementar da sequência de bases de nucleótidos do ácido nucleico (i.e., a sequência alvo) com a qual a sonda de polinucleótido vai hibridar, desde que a sonda contenha complementaridade substancial com a sequência alvo.

Por exemplo, uma porção de polinucleótido não complementar pode ser ligada ao extremo 5' da porção de polinucleótido complementar, sendo o resto da sequência de bases de nucleótidos, pelo menos, substancialmente complementar da sequência alvo. Em alternativa, bases não complementares ou grupos de bases podem ser disseminadas no polinucleótido, desde que o polinucleótido tenha suficiente complementaridade de sequência de ácidos

nucleicos com a sequência alvo com a qual se hibrida e forma um duplex de ADN que compreende a sonda de polinucleótido e o ácido nucleico específico da P. carinii.

Por "específico da P. carinii" entende-se que a referida sequência de ácidos nucleicos contém uma sequência de nucleótidos de complementaridade substancial com os seus transcritos genómicos de ADN ou ARN da P. carinii mas não tem substancial complementaridade com os transcritos genómicos de ADN ou ARN que não sejam da P. carinii. Os polinucleótidos específicos da P. carinii não hibridam, portanto, com os transcritos genómicos de ADN ou ARN que não sejam da P. carinii.

A identificação de polinucleótidos específicos da P. carinii envolve, tipicamente, uma comparação da sequência de nucleótidos genómicos da P. carinii com outras sequências conhecidas genómicas que não sejam da P. carinii, para localizar as regiões da P. carinii que não tenham complementaridade substancial com sequências de não P. carinii. As pesquisas auxiliadas por computador de bancos de dados de sequências de nucleótidos publicadas, como a GENBANK, EMBL e semelhantes, são bem conhecidas e fornecem meios rápidos para comparar sequências de nucleótidos e localizar sequências de nucleótidos com complementaridade substancial (i.e., que sejam homólogas) localizar sequências de nucleótidos que não tenham complementaridade substancial (isto é, que sejam únicas).

Quando a comparação de sequências de nucleótidos localizou regiões da P. carinii que não apresentam complementaridade substancial com as sequências de nucleótidos de não P. carinii num banco de dados publicados, prefere-se verificar a singularidade da sequência de nucleótidos num ensaio de hibridação para identificar um polinucleótido específico da P. carinii. Um ensaio de verificação de hibridação é um em que a sequência de nucleótidos da P. carinii é submetida às condições de hibridação aqui descritas, na presença de sequências de ácidos nucleicos derivados da P. carinii e, também, do grupo de diversos organismos não P. carinii, essencialmente constituído pela

Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Homo sapiens. Sequências específicas de P. carinii são as que hibridam com ácidos nucleicos de P. carinii mas que não hibridam com ácidos nucleicos dos organismos não P. carinii acima identificados.

Assim, o invento refere-se a um processo para detectar a presença de uma infecção pela P. carinii num mamífero, o qual compreende formar uma mistura reaccional de hibridação por mistura de uma amostra desnaturada do fluido vascular do mamífero com uma sonda de polinucleótido capaz de hibridar com os ácidos nucleicos específicos da P. carinii.

São exemplos de polinucleótidos específicos úteis da P. carinii, os que têm uma sequência com substancial complementaridade com porções específicas da P. carinii, da sequência de ARN ribossômico da P. carinii, sequência relatada por Edman et al., Nature, 334:519-522, 1988.

Quando o processo do presente invento detecta um produto de ácidos nucleicos amplificado, a mistura reaccional de hibridação forma-se, misturando duas sondas de polinucleótido distintas com uma amostra desnaturada do fluido vascular. Pelo menos uma das duas sondas de polinucleótido misturadas é específica da P. carinii e ambas têm sequências de nucleótidos escolhidas de modo a permitirem a amplificação de sequências híbridas de ácidos nucleicos de P. carinii pela reacção em cadeia da polimerase, como se discute mais adiante. Isto é, os dois polinucleótidos misturados compreendem a primeira e a segunda sonda de polinucleótido com sequências de nucleótidos com as seguintes características: (1) pelo menos um dos polinucleótidos é específico da P. carinii; (2) os dois polinucleótidos são substancialmente complementares a uma ou à outra cadeia de ADN genómico da P. carinii, onde o primeiro polinucleótido é complementar da cadeia mais e o segundo polinucleótido é complementar da cadeia menos de uma sequência de ácido nucleico de ADN genómico da P. carinii; (3) os dois polinucleótidos são substancialmente complementares das sequências de nucleótidos que se localizam a uma distância de cerca de 0 a cerca de 300 bases

de nucleótidos uma da outra no ADN genómico da P. carinii, de preferência cerca de 20 a cerca de 200 bases de distância; e (4) os dois polinucleótidos são substancialmente complementares das sequências de nucleótidos cuja localização relativa no ADN genómico é tal que o alvo para o primeiro polinucleótido está localizado na posição 3' na cadeia mais em relação à localização do alvo para o segundo polinucleótido.

As sondas de polinucleótido preferidas para serem usadas quando o processo em causa detectar produtos de ácidos nucleicos amplificados são o par de polinucleótidos PN03 e PN40 ou, alternativamente, o par de polinucleótidos PN20 e PR02. As sequências de base de nucleótidos de PN03, PN20, PN40 e PR02 estão indicadas no Quadro I e correspondem, com complementaridade exacta, às porções das cadeias mais e menos das sequências de ADN genómico da P. carinii que codificam o ARN ribossómico referido por Edman et al., supra.

Quadro 1

POLINUCLEÓTIDOS

<u>Designação do Polinucleótido</u>	<u>Sequência de Bases dos Nucleótidos¹</u>
PN03	AAT AAC CCA TCA CCA GTC CGA
PN20	ATT TAG ATA CCT TA
PN40	CAG AGC CAG CAA GTT CAT TT
PR02	TTA CCG CGG CTG GCA C

1 As sequências de bases de nucleótidos estão indicadas na direcção de 5' para 3' (da esquerda para a direita)

Podem preparar-se segmentos de polinucleótidos por vários processos incluindo a síntese química "de novo" de polinucleótidos e derivação dos fragmentos de ácidos nucleicos a partir das sequências de ácidos nucleicos naturais existentes como genes, ou parte de genes num genoma, plasmídeo ou outro vector como por digestão de endonuclease de restrição de

fragmentos maiores de ácidos nucleicos e separação de cadeias, ou por síntese enzimática usando um padrão de ácidos nucleicos.

A síntese química "de novo" de polinucleótidos pode ser realizada por exemplo, pelo processo fosfotriéster descrito por Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc., 103:3185 (1981), ou como se descreve na Patente E.U.A. Nº. 4 356 270.

A obtenção de um polinucleótido a partir de ácidos nucleicos envolve a clonagem de um ácido nucleico num hospedeiro adequado por meio de um vector de clonagem, réplica do vector e, portanto, a multiplicação da quantidade de ácido nucleico clonado e, depois, o isolamento de subfragmentos dos ácidos nucleicos clonados.

Para uma descrição dos fragmentos do ácido nucleico de subclonagem, veja-se Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, pp 390-401 (1982); e vejam-se as Patentes E.U.A. Nºs. 4 416 988 e 4 403 036.

3. Condições de Hibridação

O processo para detectar a infecção pela P. carinii num mamífero inclui manter a mistura reaccional de hibridação sob condições de hibridação durante um período de tempo suficiente para que a sonda de polinucleótido hibride com quaisquer sequências de ácido nucleico complementares presentes na amostra de fluido vascular, para formar um duplex de ADN híbrido.

A expressão "condição de hibridação" e expressões gramaticalmente equivalentes, quando usadas a respeito de um período de tempo de manutenção, indicam que se submete a mistura reaccional de hibridação, com as devidas concentrações de reagentes e de reagentes acompanhantes da mistura, às condições de tempo e temperatura suficientes para permitirem que o polinucleótido se tempere com a sequência-alvo de ácidos nucleicos (específicos da P. carinii) e forme um duplex de ADN de cadeia dupla. Tais condições de tempo e de temperatura necessárias para conseguir a hibridação dependem, como é bem sabido na arte, do comprimento do segmento de polinucleótido a ser hibridado, da intensidade de hibridação desejada e da

presença de sais e de reagentes adicionais na mistura reaccional de hibridação, pois podem afectar a cinética da hibridação. Os processos para otimizar as condições de hibridação, para uma dada mistura reaccional de hibridação, são ben conhecidas na arte.

As condições típicas de hibridação incluem o uso de soluções tamponizadas a valores de pH entre 5 e 9 e realizam-se a temperaturas entre 18 e 70°C, de preferência entre cerca de 55 e cerca de 65°C, durante períodos de 0,5 minutos a 24 horas. Para pequenos volumes de reacção e reacções rápidas de hibridação, como as descritas no Exemplo 3, as temperaturas de hibridação podem variar à medida que a temperatura é alterada como, por exemplo, quando se mantém, primeiro, a amostra a 100°C para desnaturar um duplex de ADN, depois, se arrefece até temperatura ambiente (RT) para hibridar e depois se aquece e mantém a 30°C para polimerização.

A hibridação pode realizar-se, como é bem sabido, de forma homogénea ou heterogénea. A reacção de hibridação homogénea ocorre inteiramente em solução, onde tanto a sonda de polinucleótido como as sequências de ácidos nucleicos a serem hibridados (alvo) estão presentes em formas solúveis e em solução. Uma reacção heterogénea envolve o uso de uma matriz que seja insolúvel no meio reaccional, à qual tanto a sonda como o ácido nucleico-alvo está ligado.

É normal preferirem-se as reacções de hibridação homogéneas tais como as descritas no Exemplo 3 em que o passo da detecção do duplex de ADN é realizado por amplificação do duplex de ADN formado numa reacção em cadeia de polimerase (PCR), adiante descrita. As reacções de hibridação heterogénea típicas incluem o uso de folhas de nitro-celulose como matriz à qual os ácidos nucleicos-alvo estão ligados.

4. Detecção de um Duplex de ADN

Após a formação de um duplex de ADN híbrido, o processo do presente invento considera a detecção da presença de um duplex de ADN contendo uma sonda de polinucleótido formado na reacção de

hibridação e, portanto, a detecção da presença de infecção pela P. carinii no mamífero do qual se obteve a amostra.

A detecção dos duplex de ADN formados pode conseguir-se por diversos meios e, ainda que se prefiram as concretizações aqui descritas para detecção de duplex de ADN, faz-se notar que outros meios, bem conhecidos, para detecção do duplex, evidentes para o perito na arte, são adequados para uso no processo presentemente considerado e no sistema de diagnóstico associado.

Numa das concretizações, o passo de detecção do duplex de ADN compreende detectar um produto de ácido nucleico amplificado. Um produto de ácido nucleico amplificado é o produto de um processo de amplificação, bem conhecido na arte, que é referido como reacção em cadeia de polimerase (PCR). O produto amplificado é produzido quando a PCR se realiza na presença de um duplex de ADN contendo uma sonda de polinucleótido específica da P. carinii.

Assim, concretizações que consideram a detecção de um produto de ácido nucleico amplificado inclui, como etapas, uma primeira amplificação por PCR de qualquer duplex de ADN formado na reacção de hibridação para formar um produto de ácido nucleico amplificado e, depois, a detecção da presença de qualquer produto de ácido nucleico amplificado formado.

A PCR realiza-se em ciclos onde cada ciclo compreende tipicamente os seguintes passos:

(1) Mantém-se uma mistura reaccional PCR durante um período de tempo e a uma temperatura suficientes para desnaturar qualquer duplex de ADN, do que resulta uma separação de cadeias e a formação de ácidos nucleicos de uma só cadeia. Desnaturar um duplex de ADN de modo a formar ácidos nucleicos de uma só cadeia é bem conhecido e pode conseguir-se em diversas condições. Sob a forma PCR, a desnaturação do duplex realiza-se tipicamente rapidamente, em cerca de 10 segundos a 5 minutos, de preferência cerca de 1 minuto, e a temperaturas de cerca de 90°C a 100°C, de preferência 95°C, para conseguir uma rápida desnaturação (fusão do duplex).

(2) A mistura desnaturada do passo (1), acima, é mantida durante um período de tempo e a uma temperatura suficientes para produzir condições de hibridação, em que as sondas de polinucleótidos específicas da P. carinii hibridam com sequências-alvo complementares de nucleótidos específicos da P. carinii para formar duplex de ADN. As condições de hibridação foram descritas anteriormente e são adequadas ao uso da forma PCR. Contudo, é preferível e conveniente conduzir a hibridação por breves períodos de tempo, em 5 segundos a 3 minutos, de preferência em um minuto, e na zona de temperaturas de 30°C a 75°C, de preferência a cerca de 55°C a 65°C.

(3) A mistura hibridada do passo (2), acima, é então mantida durante um período de tempo e a uma temperatura suficientes para que ocorra uma reacção de extensão inicial da polimerase do ADN para produzir produtos de extensão iniciais como é bem conhecido. As condições de realização das reacções de extensão iniciais são já bem conhecidas. Na forma PCR a manutenção realiza-se rapidamente para facilitar convenientemente numerosos ciclos, em cerca de 1 segundo a 5 minutos, de preferência em cerca de 2 minutos, e a cerca de 55°C a 75°C, de preferência a cerca de 65°C. A condução de vários ciclos de PCR tem como resultado a formação de produtos de ácido nucleico amplificado. Tipicamente a PCR realiza-se com pelo menos 15 ciclos e, de preferência, com cerca de 20 a 35 ciclos.

Quanto a métodos gerais e condições de realização de uma reacção em cadeia de polimerase, vejam-se as Patentes E.U.A. nºs, 4 683 202 e 4 683 195.

Quando se executa a detecção de um duplex de ADN prefere-se que o duplex seja um duplex de ARN-ADN formado entre o ARN ribossómico (rARN) da P. carinii presente na amostra de fluido vascular e um polinucleótido. Neste caso, a detecção de um produto de ácido nucleico amplificado é precedida pela amplificação do duplex de ARN-ADN.

A amplificação de um duplex de ARN-ADN envolve, primeiro, a preparação de uma molécula de ADN complementar (cADN) a partir do

duplex de ARN-ADN e depois a subsequente amplificação da molécula de cADN para se formar um grande número de cópias de cADN.

A preparação de cADN a partir de um duplex de ARN-ADN é também já bem conhecida. Veja-se por exemplo Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. A preparação de cADN a partir de uma molécula de ARN tendo uma sonda de polinucleótido de ADN (e. g. um iniciador) nela hibridada, implica normalmente misturar o duplex de ARN-ADN com os deoxinucleótidos dGTP, dATP, dTTP e dCTP na presença de sais de magnésio e de um tampão aquoso e manter a mistura na presença de um enzima de transcriptase inversa (RT), de preferência o vírus RT da mieloblastose avícola (AMV-RT), a uma temperatura e por um período de tempo suficientes para formar, pelo menos, uma cópia cADN da molécula de ARN presente no duplex. As condições preferidas de preparação de cADN estão descritas no Exemplo 1.

A detecção da presença de um duplex de ADN num processo do presente invento pode conseguir-se por diversos meios.

Numa aproximação para detectar a presença de um duplex de ADN, uma sonda de polinucleótido que esteja hibridada num duplex de ADN inclui em marcador ou grupo indicador que tornará o duplex detectável. Normalmente, estes marcadores incluem átomos radioactivos, bases de nucleótidos modificadas quimicamente e semelhantes.

Os elementos radioactivos ligados operativamente ou presentes como parte de uma sonda de polinucleótido, constituem um meio útil para facilitar a detecção de um duplex de ADN. Um elemento radioactivo típico é aquele que produz emissões de raios beta. Os elementos que emitem raios beta, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P e ^{35}S , representam uma classe de marcadores de elementos radioactivos emissores de raios beta. Uma sonda de polinucleótido radioactiva é, normalmente, preparada por incorporação enzimática de nucleótidos marcados radioactivamente num ácido nucleico usando polimerase de ADN e depois o ácido nucleico marcado é desnaturado para constituir uma sonda de polinucleótido marcada

radioactivamente.

Constituem alternativa para os polinucleótidos marcados radioactivamente, os polinucleótidos que são quimicamente modificados de modo a conterem agentes complexantes de metal, grupos contendo biotina, compostos fluorescentes e semelhantes.

Um agente útil de complexação de metal é um quelato de lantanido formado por um lantanido e uma beta-dicetona aromática, estando o lantanido ligado ao ácido nucleico ou ao polinucleótido por um composto formador de quelato como um análogo do EDTA, de modo a formar-se um complexo de lantanido fluorescente. Ver as Patentes E.U.A. Nº. 4 374 120, Nº. 4 569 790 e Pedido Publicado de Patente Nº. EP0139675 e W087/02708.

Foram já descritos os oligonucleótidos marcados com éster de acridina ou biotina, e o seu uso para marcar os polinucleótidos. Ver a Patente E.U.A. Nº. 4 707 404, Pedido Publicado de Patente EP0212951 e Patente Europeia Nº. 0087636. São compostos fluorescentes marcadores úteis a fluoresceína, a rodamina, Texas Red, NBD e semelhantes.

Um polinucleótido marcado presente num duplex de ADN torna o próprio duplex marcado e portanto distinguível de outros ácidos nucleicos presentes na amostra a ser avaliada. A detecção da presença do marcador no duplex e portanto a presença do duplex envolve, tipicamente, a separação do duplex de ADN de qualquer sonda de polinucleótido marcada que não esteja hibridada com um duplex de ADN.

As técnicas de separação de polinucleótidos de uma só cadeia, tais como sondas de polinucleótidos marcadas, não hibridadas, de duplex de ADN são bem conhecidas e normalmente envolvem a separação de ácidos nucleicos de uma só cadeia dos de cadeia dupla, com base nas suas propriedades químicas. Mais frequentemente as técnicas de separação envolvem o uso de uma forma de hibridação heterogénea onde a sonda não hibridada é separada, normalmente por lavagem, do duplex de ADN que está ligado a uma matriz insolúvel. É exemplo a técnica de mancha de Southern, onde a matriz é uma folha de nitrocelulose e o marcador

é 32p. Southern, J. Mol. Biol., 98:503 (1975).

Numa outra aproximação para detectar a presença de um duplex de ADN, e aquela aqui usada como exemplo duma das concretizações preferidas, o duplex de ADN é amplificado como aqui se descreveu e o produto de ácido nucleico amplificado resultante é detectado. A presença do produto amplificado indica a presença de infecção pela P. carinii.

A detecção de um produto de ácidos nucleicos amplificados pode obter-se por qualquer das diversas técnicas bem conhecidas. Numa concretização preferida, o produto amplificado é separado, com base no peso molecular, por electroforese em gel e os produtos separados são então visualizados pelo uso de corantes específicos dos ácidos nucleicos que nos permitem observar as espécies individualizadas do produto amplificado resolvido, presente no gel. A presença de um produto amplificado particular, isto é, um que tenha um peso molecular específico quando separado pela electroforese em gel, indica que os polinucleótidos estiveram presentes no duplex de ADN e actuaram como iniciadores na reacção PCR para produzir cópias múltiplas de um ácido nucleico com uma sequência de nucleótidos individualizados que inclui a sequência-alvo de nucleótidos. Ainda que existam numerosos corantes específicos para ácidos nucleicos, adequados para visualizar os ácidos nucleicos separados por electroforese, prefere-se o brometo de etídio aqui usado como exemplo.

Métodos alternativos adequados para detectar o produto de ácido nucleico amplificado incluem meios de detecção baseados na hibridação que usam uma sonda de polinucleótido marcada, capaz de hibridar o produto amplificado. São exemplos destes meios de detecção, a análise de mancha Southern acima descrita, a análise de protecção de ribonuclease usando sondas de poli-ribonucleótido marcadas in vitro e métodos semelhantes para detectar ácidos nucleicos com sequências específicas de nucleótidos. Ver, por exemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987.

5. Sondas, composição e conjuntos

Noutra concretização do presente invento consideram-se sondas de polinucleótidos específicas, composições e conjuntos de diagnóstico contendo aquelas sondas de polinucleótidos. Uma sonda de polinucleótido considerada tem menos de cerca de 100 nucleótidos de comprimento, de preferência menos de cerca de 50 e, ainda com maior preferência, entre cerca de 20 a cerca de 30 nucleótidos de comprimento. De preferência, toda a sequência de nucleótidos de uma sonda de polinucleótido considerada é idêntica à sequência de ARN da P. carinii indicada na Figura 1 de Edman et al., Nature, 334:519-522 (1988).

Uma sonda de polinucleótido do presente invento é ainda caracterizada por incluir uma das sequências indicadas no Quadro 1.

Também se considera uma composição que contenha, em quantidades molares aproximadamente iguais, várias destas sondas de polinucleótido que não se hibridam substancial e mutuamente. De preferência as sondas presentes têm comprimento aproximadamente igual. De preferência a composição contém duas sondas, incluindo, a primeira, a sequência de PN03 e, a segunda, a sequência de PN40.

Também se considera um sistema de diagnóstico, sob a forma de "kit", para pesquisar a P. carinii numa amostra de fluido vascular, contendo uma das sondas e/ou uma composição, referidas. A sonda ou composição estará presente numa quantidade suficiente para realizar pelo menos um ensaio.

Muitos dos compostos e grupos envolvidos na presente especificação (e.g., ácidos nucleicos) têm diversas formas, formas protonadas particularmente variáveis, em equilíbrio entre si. Como o perito compreenderá, a representação aqui citada de uma forma de um composto ou grupo pretende incluir todas as suas formas que estejam em equilíbrio entre si.

Na especificação presente, " μM " significa micromolar, " μl " significa microlitro e " μg " significa micrograma.

Exemplos

Os seguintes exemplos são dados apenas para ilustrarem o invento e não limitam de nenhum modo o seu âmbito.

1. Síntese de Polinucleótidos

Os polinucleótidos PN03 e PN40, com as sequências de oxirribonucleótidos indicadas no Quadro 1, foram preparados por síntese química pela Synthetic Genetics Inc. (San Diego, CA).

Após síntese química, cada polinucleótido foi purificado por electroforese em gel de poliacrilamida sobre geles a 15%, desprotegido em hidróxido de amónio durante 16 horas a 65°C e depois armazenado, até uso, a -70°C a uma concentração de cerca de 250 µg/ml de água.

2. Preparação de antigénio de cisto de *P. carinii*

Ratazanas macho Sprague Dawley que foram infectados, de forma latente, com *P. carinii*, foram imunossuprimidas para que desenvolvessem a pneumonia da *P. carinii*. A imuno-supressão foi conseguida pelo seguinte regime de medicação adicionado à sua água de beber: 2 mg/l de prednisolona (9-alfa-fluoro-16-alfa-metil-prednisolona) durante 18 dias, nenhuma prednisolona durante 10 dias e 1-1,5 mg/l de prednisolona durante 2,5 meses. Juntou-se também tetraciclina-HCl a uma concentração de 500 mg/l à água de beber, intermitentemente, para evitar mortes por infecções bacterianas. Seis a oito semanas depois da imuno-supressão, as ratazanas pneumónicas foram sacrificadas e os tecidos dos pulmões infectados com *P. carinii* foram retirados. Impressões por toque ("touch imprints") preparadas a partir dos pulmões de cada animal, foram examinadas quanto à presença de cistos de *P. carinii* corando com azul O de toluidina de acordo com os métodos de Chalvavdjian e Grawe, J. Clin. Pathol., 16:383, 1963. Os pulmões infectados com *P. carinii* foram homogeneizados com um misturador Waring. Fez-se passar o homogeneizado por gaze de algodão para remover quaisquer grandes aglomerados de tecidos e passou-se depois por um filtro 12MM (Nuclepore, Pleasanton, CA). O homogeneizado filtrado foi centrifugado a 400 x g durante

30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante resultante foi deitado fora e o bolo foi ressuspenso em cerca de 5 volumes de solução salina, de fosfato tamponizado (PBS, pH 7,2) suplementado com 200 U de penicilina/ml, 200 mg de estreptomicina/ml (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) e 4 mg de anfotericina B/ml para inibir qualquer crescimento bacteriano ou fúngico. O número de cistos de P. carinii presentes foi determinado de acordo com Pifer et al., Pediatr. Res. 11:305-316, 1977. Os cistos isolados de P. carinii foram guardados em pequenas aliquotas a -70°C.

3. Deteccção de Ácidos Nucleicos Especificos da P. carinii no Sangue de uma Ratazana Infectada com P. carinii

Cada uma das seguintes amostras foram separadamente misturadas com 100 µl de acetona para iniciar a preparação de uma amostra desnaturada: (i) 5 µl de sangue de uma ratazana com pulmões infectados pela P. carinii, (ii) 5 µl de sangue de uma ratazana normal (controlo negativo), (iii) 1 µl de rARN isolado de P. carinii, contendo 0,224 µg de rARN (controlo positivo), (iv) 1 µl de água estéril (controlo negativo) e (v) 1 µl de uma suspensão de cistos isolados de P. carinii. As misturas foram então mantidas a 100°C durante 5 minutos, depois misturadas com 86 µl de água estéril e mantidas a 100°C durante 10 min para constituírem amostras desnaturadas.

As amostras desnaturadas foram centrifugadas a 12 000 x g numa microcentrifuga para peletizar quaisquer fragmentos presentes. Cada amostra clarificada foi então misturada com 10 µl de tampão 10 x TAQ (100 mM de Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 1,8 mM de cada dGTP, dATP, dTTP e dCTP e 100 µg/ml BSA), 2 µl de uma solução contendo 200 picomoles (pmol) de polinucleótido PN03 e 2 µl de uma solução contendo 200 pmol de polinucleótido PN40, tendo cada nucleótido sido preparado no Exemplo 1. A mistura foi, primeiro, mantida a 100°C durante 2 min, depois, mantida à temperatura ambiente em banho de água durante 1 min, para constituir uma mistura de tampão TAQ.

Misturou-se um µl de uma solução contendo 27,5 U de transcriptase inversa de vírus da mieloblastose avícola (AMV-RT)

com a mistura tampão TAQ e manteve-se, depois, a 45°C durante 2 min para formar uma cópia cADN de qualquer ARN presente na mistura tampão TAQ. Misturaram-se 2 µl de uma solução contendo 5 U de polimerase de ADN de *Thermus aquaticus* (TAQ) com a mistura que continha a cADN para constituir uma primeira mistura de reacção em cadeia de polimerase (PCR). A mistura resultante PCR foi submetida a numerosos ciclos de PCR, como abaixo se descreve, para formar o produto de ácido nucleico amplificado. Um ciclo de PCR consiste em manter a mistura primeiro a 95°C durante 1 min, depois a 30°C durante 1 min, e, finalmente, a 65°C durante 2 min. Depois da mistura ter sido submetida a 12 ciclos de PCR, retiraram-se 8 µl da mistura ciclizada que se guardaram, misturou-se 1 µl de polimerase de ADN TAQ com a restante mistura de PCR e submeteu-se a mistura a mais 8 ciclos PCR. Retiraram-se e guardaram-se 8 µl da mistura ciclizada e as misturas guardadas após 12 ciclos ou 20 ciclos foram ambas analisadas por electroforese em gel de agarose para detectar as moléculas de ácidos nucleicos do duplex de ADN amplificado por PCR, contido nas amostras guardadas.

O PCR tratado e as amostras guardadas foram, cada um, misturados com 2 µl de tampão de carga de gel de agarose e as misturas foram submetidas a electroforese durante 1 h a 120 V num gel de agarose a 4% Nu-Seive contendo 0,5 µg/µl de brometo de etidio (EtBr) em tampão 1 x TBE. O tampão TBE foi preparado diluindo o tampão 10 x TBE até 1 X usando água. O tampão EDTA foi preparado misturando 2 g NaOH e 18,6 g de EDTA dissódico em 100 ml de água. O 10 x TBE foi preparado misturando 108 g Tris-base, 55 g ácido bórico em pó, 40 ml tampão EDTA e EtBr até uma concentração final de 0,5 µg/ml, tudo num volume de 1 l de água. O tampão de carga contendo 0,1% de corante azul de bromofenol, 33% sacarose, 0,5 µg/ml EtBr e 1 x TBE. Após electroforese em gel, os duplex de ADN foram visualizados expondo o gel a uma fonte de luz UV e fotografando os ácidos nucleicos iluminados.

Os resultados obtidos pelo processo referido mostram a detecção de uma banda iluminada de ácido nucleico de aproximadamente 220 pares de base (bp) de nucleótidos de peso

molecular aparente. A banda de 220 bp foi observada em amostras processadas após 20 ciclos PCR em ratazanas infectadas pela P. carinii, a partir de rARN isolado da P. carinii ou a partir de cistos isolados de P. carinii. Também se observaram níveis baixos da banda de 220 bp em amostras processadas após 20 ciclos PCR em ratazanas normais de controlo, mas a banda desmaiada observada crê-se que reflecte a sensibilidade do processo na detecção de pequenas quantidades de P. carinii indigena em ratos normais. Observaram-se baixos níveis da banda de 220 bp em amostras processadas a partir do controlo negativo de água mas crê-se que o resultado derive da electroforese, por contaminação cruzada das pistas de gel adjacentes que continham rARN isolado da P. carinii como controlos positivos.

Um peso molecular de 220 bp para a banda iluminada está de acordo com o tamanho aproximado previsto para um produto de ácidos nucleicos amplificados produzido pelo uso de polinucleótidos PN03 e PN40 por PCR. Portanto, a visualização da banda de 220 bp representa a detecção de produtos de ácidos nucleicos amplificados específico da P. carinii e representa, portanto, a detecção de uma infecção pela P. carinii nas ratazanas.

Foram também usados os polinucleótidos PN20 e PR02, preparados como se descreveu no Exemplo 1, no processo de detecção acima descrito, em lugar dos polinucleótidos PN40 e PN03. Os resultados obtidos pela condução do processo de detecção com PN20 e PR02, nas mesmas amostras, deram um produto de ácidos nucleicos amplificados com um peso molecular de cerca de 59 bp. O peso molecular de 59 bp está de acordo com o tamanho previsto de um produto de ácidos nucleicos amplificados produzidos por PCR usando os polinucleótidos PN20 e PR02. Observou-se o produto amplificado 59 bp quando o processo foi realizado em amostras de sangue de ratazanas infectadas pela P. carinii, rARN isolado de P. carinii isolada ou de cistos isolados de P. carinii, mas não foi observado quando as amostras de controlo foram processadas. A visualização do produto amplificado de 59 bp representa portanto a detecção de infecção pela P. carinii quando se usam sondas de

polinucleótidos PN20 e PR02.

4. Detecção de Ácidos Nucleicos Específicos da *P. carinii* no Sangue de um Homem Infectado pela *P. carinii*

Foram obtidas amostras de soro de pacientes humanos clinicamente diagnosticados como tendo quer soro positivo HIV quer pneumonia por *P. carinii* ou com HIV negativo e sem pneumonia. As amostras de soro foram depois tratadas como se descreveu no Exemplo 3 com as seguintes excepções conforme se indicam. Depois das amostras desnaturadas serem misturadas com tampão 10 x TAQ e polinucleótidos, 1 µl de polimerase de ADN TAQ foi, depois, misturado e submeteu-se a mistura resultante a 35 ciclos de PCR. Depois, retiraram-se 8 µl de mistura ciclizada e analisou-se por electroforese em gel como atrás.

Os resultados obtidos pelo processo referido mostram a detecção da mesma banda de 220 bp como a descrita no Exemplo 3. Tanto o anti-soro do paciente HIV positivo obtido de pacientes tendo pneumonia, já reconhecida, de *P. carinii*, como a amostra de cistos isolados de *P. carinii* mostraram ambos uma banda de 220 bp depois de serem submetidos ao processo de detecção acima referido. Nem o anti-soro do paciente sem *P. carinii* e com HIV negativo nem um controlo negativo de água mostraram qualquer banda de 220 bp detectável, evidenciando a especificidade do processo considerado.

A referida detecção de produtos de ácidos nucleicos específicos da *P. carinii* amplificados foi realizada sem utilizar a transcriptase inversa (RT) em contraste com o processo usado no Exemplo 3. A detecção de produtos de ácidos nucleicos amplificados sem utilizar a RT indica que o anti-soro de pacientes infectados com *P. carinii* contém duplex ADN-ARN que são detectáveis pelo processo descrito. A visualização de um produto de ácidos nucleicos específicos da *P. carinii* e, portanto, a detecção da infecção pela *P. carinii* no homem, pode, pois, ser realizada seguindo os preceitos do processo referido.

A descrição precedente e os exemplos ilustram o presente invento mas não pretendem limitar o seu âmbito.

71 001

XYT0033P

-24-

Os peritos na arte reconhecerão as modificações e variações dos arranjos exemplificados que estão dentro do espírito e do âmbito do invento aqui descrito e reivindicado.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo de detecção da presença de uma infecção por Pneumocystis carinii num mamífero em particular um ser humano, caracterizado por compreender:

(a) misturar uma amostra de fluido vascular desnaturado, do referido mamífero, com uma sonda polinucleotídica de Pneumocystis carinii, capaz de se hibridar com o ADN genómico de Pneumocystis carinii ou com um seu transcrito de ARN,

(b) manter a referida mistura sob condições de hibridação, durante um período de tempo suficiente para que a referida sonda se hibridize com qualquer sequência de ácido nucleico complementar presente na referida amostra, de modo a formar um duplex hibridado, e

(c) detectar a presença de qualquer duplex formado no passo (b) e, por este meio, a presença de infecção por Pneumocystis carinii no referido mamífero.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida sonda polinucleotídica ser uma sequência que é complementar a uma porção específica e Pneumocystis carinii da sequência nucleotídica de ARN ribossómico de Pneumocystis carinii.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido passo (c) compreender a detecção de um produto de ácido nucleico amplificado.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a primeira e segunda sondas polinucleotídicas serem misturadas no passo (a), possuindo sequências de ácidos nucleicos representadas pelas fórmulas:

CAG AGC CAG CAA GTT CAT TT, e
AAT AAC CCA TCA CCA GTC CGA,

respectivamente.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a primeira e segunda sondas polinucleotídicas serem misturadas no passo (a), possuindo sequências de ácidos nucleicos

representadas pelas fórmulas:

CAG AGC CAG CAA GTT CAT TT, e
AAT AAC CCA TCA CCA GTC CGA,

respectivamente.

6 - Processo de detecção da presença de uma infecção por Pneumocystis carinii num paciente, caracterizado por compreender:

(a) desproteinar ácidos nucleicos de cadeia dupla de uma amostra de fluido vascular do referido paciente,

(b) separar as cadeias dos referidos ácidos nucleicos desproteïnados para formar moldes de cadeia simples complementares,

(c) tratar os referidos moldes de cadeia simples complementares, sob condições adequadas para amplificação por reacção da cadeia com polimerase, com um primeiro e segundo polinucleótidos seleccionados de modo a serem capazes de amplificar um ácido nucleico específico de Pneumocystis carinii, e

(d) detectar a presença de qualquer produto de amplificação de ácido nucleico específico de Pneumocystis carinii formado no passo (c) e por este meio a presença de uma infecção por Pneumocystis carinii no referido paciente.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o primeiro e segundo polinucleótidos serem misturados no passo (c), possuindo seqüências de ácidos nucleicos representadas pelas fórmulas:

CAG AGC CAG CAA GTT CAT TT, e
AAT AAC CCA TCA CCA GTC CGA,

respectivamente.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o primeiro e segundo polinucleótidos serem misturados no

71 001
XYT0033P

-27-

passo (c), possuindo sequências de ácido nucleico representadas pelas fórmulas:

ATT TAG ATA CCT TA, e
TTA CCG CGG CTG GCA C.

9 - Processo de preparação de um polinucleótido com menos de cerca de 100 nucleótidos de comprimento, incluindo o polinucleótido uma sequência representada pela fórmula:

CAG AGC CAG CAA GTT CAT TT, ou
AAT AAC CCA TCA CCA GTC CGA

caracterizado por se realizar uma síntese química pelo método do fosfotriéster.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 9 de preparação de um polinucleótido consistindo essencialmente na sequência

CAG AGC CAG CAA GTT CAT TT, ou
AAT AAC CCA TCA CCA GTC CGA

caracterizado por se realizar a síntese química do referido polinucleótido pelo método do fosfotriéster.

11 - Processo de preparação de uma composição compreendendo, em quantidades molares aproximadamente iguais, um primeiro e segundo nucleótidos que não se hibridam um com o outro e que possuem, cada um, menos de cerca de 100 nucleótidos incluindo o referido primeiro polinucleótido a sequência de nucleótidos:

CAG AGC CAG CAA GTT CAT TT,

e incluindo o referido segundo polinucleótido a sequência de nucleótidos:

ATT AAC CCA TCA CCA GTC CGA

caracterizado por compreender os passos de:

(a) síntese química dos referidos primeiro e segundo polinucleótidos pelo método do fosfotriéster, e

(b) mistura, em quantidades molares aproximadamente iguais, dos referidos primeiro e segundo polinucleótidos produzidos no

71 001
XYT0033P

-28-

passo (a), de modo a formar a referida composição.

12 - Processo de preparação de uma composição compreendendo, em quantidades molares aproximadamente iguais, um primeiro e segundo polinucleótidos, representados pelas fórmulas, respectivamente:

CAG AGC CAG CAA GTT CAT TT, e
ATT AAC CCA TCA CCA GTC CGA

caracterizado por compreender os passos de:

(a) síntese química dos referidos primeiro e segundo polinucleótidos pelo método do fosfotriéster, e

(b) mistura, em quantidades molares aproximadamente iguais, dos referidos primeiro e segundo polinucleótidos produzidos no passo (a), de modo a formar a referida composição.

Lisboa, 10. MAI 1990

Por XYTRONYX, INC.
- O AGENTE OFICIAL -

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'X' followed by several loops and a long horizontal stroke extending to the right.