

FOLHA DO RESUMO

Modalidade e n.º (11) 98.356	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
Requerente (71): IAF BioChem International Inc., canadiana, industrial, com sede em 10900 Hamon Street, Montreal, Quebec H3M 3A2, Canadá			
Inventores (72): MARTIAL LACROIX e MAAN ZREIN			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
18.07.1990	US	07/554,258	
20.03.1991	US	07/672,483	
Epigrafe: (54) "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PÉPTI- DOS HTLV E OS SEUS ANÁLOGOS"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) Descreve-se um processo para a preparação de novos péptidos lineares e suas misturas e associações químicas úteis para detectarem e quantificarem infecções HTLV-I e HTLV-II que consiste em métodos sintéticos ou recombinantes. Estes péptidos são também úteis em vacinas contra infecções virais HTLV-I e HTLV-II. Também se descreve um método para a preparação de composições farmacêuticas que incluem esses péptidos as suas misturas ou associações como componente activo e que se destinam ao tratamento das infecções virais referidas antes. <i>Ag. L. 1</i>			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBRADAS

"PÉPTIDOS, SEUS ANÁLOGOS E SUAS MISTURAS PARA A DETECÇÃO DE
ANTICORPOS PARA OS VÍRUS HTLV-I e HTLV-II"

DOMINIO TÉCNICO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a novos peptidos lineares e suas misturas e combinações químicas úteis para a detecção e para a quantificação de infecções originadas pelos VLTH-I e VLTH-II. Esses peptidos também são úteis para a preparação de vacinas contra as infecções virais originadas pelos VLTH-I e VLTH-II.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O subgrupo I dos vírus da leucemia das células T humanas (VLTH-I) é um retrovírus estreitamente associado com o linfoma/leucemia das células T dos adultos (LTA) (Poiesz et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 7415-7419). Está também associado a doenças neurológicas designadas por paraparese espástica tópica e à mielopatia associada ao VLTH-I

(MAH) (Gessain et al., 1985, Lancet ii, 407-410). O subgrupo II dos vírus da leucemia das células T humanas (VLTH-II) foi isolado inicialmente a partir de um paciente com leucemia celular filamentosa das células T (Kalyanaraman et al., 1982, Science, 218, 571-573). Está associado à variante da leucemia celular filamentosa das células T.

Os genomas VLTH-I e VLTH-II existem sob a forma de pro-vírus no ADN cromossômico humano de células leucêmicas. As suas frequências nucleotídicas completas foram já identificadas (Seiki et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 3618-3622; Shimotohno et al., 1985, Ibid., 82, 3101-3105). Tal como sucede com outro retrovírus, os genomas VLTH-I e VLTH-II são flanqueados por estruturas de tipo RTL (repetições de terminal longo) para as quais se admite que desempenhem uma função essencial na integração do ADN pró-viral no interior do ADN cromossômico do hospedeiro. Foram identificados quatro genes principais que ocupam as seguintes posições relativas no genoma: LTR-gag-pol-env-pX-LTR (Seiki et al.; Shaw et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 4544-4548). O gene gag codifica uma proteína precursora de 48 000 dalton (frequentemente designada por p53) constituída por 429 aminoácidos (433 para o VLTH-II). Esta proteína precursora é clivada em pelo menos três proteínas menores (Figura 2). O gene pol codifica a transcriptase inversa viral. O gene env presumivelmente codifica uma proteína de 54 000 dalton a qual é glicosilada e posteriormente clivada em duas glicoproteínas designadas por gp46 e gp21. Foram assinalados pesos moleculares ligeiramente diferentes para aquilo que muito provavelmente são os mesmos produtos protéicos no gene env). A última região codificadora é designada por pX e admite-se que codifique quatro proteínas (tax₁, tax₂, rex₁, rex₂) implicadas na expressão e na regulação do gene.

Conforme assinalado nas Figuras 1 e 2, as proteínas env e as proteínas gag dos VLTH-I e VLTH-II partilham em elevado grau a homologia da sequência dos aminoácidos. Além disso, foi assinalada inter-reactividade serológica entre as proteínas do VLTH-I e as proteínas do VLTH-II (Lee et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 7579-7583). Apesar desta semelhança estrutural e desta inter-reactividade, algumas regiões dessas proteínas env e gag apenas são reconhecidas por anticorpos existentes num paciente infectado pelos VLTH-I ou VLTH-II.

Os VLTH-I e VLTH-II diferem dos vírus da imunodeficiência humana (VIH) pelas suas estruturas morfológicas e genéticas. Em consequência, os anticorpos contra as proteínas dos VIH não devem inter-reagir com os antígenos dos VLTH-I e VLTH-II. Todavia, algumas amostras de soro extraídas de pacientes com SIDA demonstraram possuir algum grau de inter-reactividade com os antígenos dos VLTH (Essex et al., 1983, Science, 220, 859-862).

Os linfomas/leucemias das células T dos adultos (LTA) ocorrem principalmente no sudoeste do Japão, na bacia das Caraíbas e em algumas partes da América Central e do Sul. Nessas regiões a seroprevalência varia entre 5% e 15% na população em geral e atinge 30% nos grupos etários superiores. Nos Estados Unidos da América do Norte as infecções com os VLTH-I/II existem principalmente nos utilizadores de drogas intravenosas (UDIV). Numa sondagem recentemente efectuada pela Cruz Vermelha Americana (Williams et al., 1988, Science, 240, 643-646), foi possível detectar anticorpos contra o VLTH-I em 10 elementos de uma amostra aleatória de 39 898 doadores de sangue em oito cidades norte americanas; isto representa uma taxa de seroprevalência da ordem de 0,025%. Um

estudo semelhante implicando 3 158 indivíduos do norte do Egipto permitiu identificar dois portadores (taxa de prevalência de 0,06%) (El-Farrash et al., 1988, Microbiol. Immunol., 32, 981-984). Nesses dois estudos não foi claramente definida a distinção entre infecção com VLTH-I e com VLTH-II. Esses dados indicam que existe uma necessidade de dispor de um teste mais fiável para despistar todas as amostras de sangue destinadas aos bancos de sangue com o objectivo de se evitar a disseminação inadvertida do vírus pelos pacientes que recebem o produto sanguíneo.

A técnica anterior desenvolveu diversas tentativas para conseguir esses testes. Nenhum deles foi bem sucedido no que diz respeito à detecção em todas as amostras de soro e de plasma que fazem parte de um painel comercial bem caracterizado de fluídos infectados com os VLTH. Por outro lado, nenhum deles é capaz de detectar uma infecção dos VLTH para níveis muito fracos de modo a garantir consequentemente a segurança do fornecimento de sangue e o imediato e precoce tratamento das infecções dos VLTH.

Saxinger e seus colaboradores (1984, Science, 225, 1473-1476) descreveram a utilização da partícula VLTH-I como imunoadsorvente num imunoensaio enzimático (IEE) para a detecção dos anticorpos para o vírus. De acordo com um aperfeiçoamento deste teste de primeira geração, foram utilizados antígenos específicos dos VLTH em vez de partículas virais como imunoadsorvente. Por exemplo, Samuel e seus colaboradores (1984, Science, 225, 1094-1097) descrevem antígenos obtidos pela tecnologia do ADN recombinante. Esses antígenos detectaram cada um de 11 soros que continham anticorpos contra o VLTH-I através de um imunoensaio enzimático baseado num lisato viral global semelhante ao que

foi desenvolvido por Saxinger e seus colaboradores. Slamon e seus colaboradores (PCT/US85/01803) descreveram ensaios utilizando polipeptidos e seus fragmentos associados com sítios imunogênicos existentes nas proteínas da região pX dos VLTH-I e VLTH-II. A precisão indicada para esses ensaios variou entre 77% e 87%. Fukui e seus colaboradores (Pedido de patente Europeia nº 87116787) descrevem ensaios utilizando polipeptidos codificados por um gene fundido constituído pela totalidade ou por uma parte do gene gag e pela totalidade ou por uma parte do gene env. A sensibilidade assinalada foi de 100% (57/57) sem nenhuns falsos positivos.

Embora esses resultados pareçam impressionantes, provavelmente não é possível repeti-los com soros, tais como a maioria dos soros usuais nos Estados Unidos da América, os quais se caracterizam por titulações dos anticorpos muito menores do que as dos soros japoneses utilizados para validar os ensaios anteriores.

Foram também descritos ensaios em que se utiliza peptidos derivados das proteínas dos VLTH-I e VLTH-II por exemplo, Palker e seus colaboradores (1989, J. Immunol., 142, 971-978) descreveram nos seus estudos que os anticorpos nos soros de 28 de entre 36 pacientes (78%) reagiram com um peptido que abrange os aminoácidos 190 a 209 da membrana envolvente do VLTH-I (peptido 4a; env 190-209).* Dez das 35

* Nesta memória descritiva utiliza-se a sequência e a numeração dos aminoácidos publicada por Seiki e seus colaboradores (supra) e por Shimotohno e seus colaboradores (supra) para os produtos génicos dos VLTH-I e VLTH-II (apenas por facilidade de referência).

amostras dos soros (29%) reagiram com o peptido 6 (env 296-312) e 6 em 33 (18%) ligaram-se ao peptido 7 (env 374-392). Palker e seus colaboradores (1986, J. Immunol., 136, 2393-2397) referiram-se também a um peptido (SP-71; gag 120-130) que reagiu com 16 em 18 amostras seropositivas em VLTH-I.

Copeland e seus colaboradores (1986, J. Immunol., 137, 2945-2951) descreveram um peptido (SP-70; env 296-306) que reconhece anticorpos de 4 em 12 indivíduos seropositivos em VLTH-I.

Wang e seus colaboradores (Patente norte americana nº 4833071) descreveram três peptidos lineares sobrepostos abrangendo as regiões da proteína da transmembrana (gp21) do VLTH-I. Esses peptidos (env 381-400, env 377-400 e env 378-393), quando utilizados numa mistura, detectaram 102 em 102 amostras de soro provenientes de pacientes com LTA e detectaram 5 em 30 pacientes com SIDA/CAS (complexo associado à SIDA). Não foi encontrada imunorreatividade contra os soros de 12 sujeitos normais ou de 12 pacientes com doenças autoimunes.

Reyes (PCT/WO89/06543) refere-se a um antígeno peptídico recombinante de 41 aminoácidos, não glicosilado, derivado da gp46 do VLTH-I. Este peptido recombinante, env (163-203), foi utilizado num ensaio de fase sólida para a determinação dos anticorpos do soro em seis pacientes com infecção de VLTH-I.

Vahlne (PCT/WO89/08664) descreve quatro peptidos sintéticos, A, B, C e H, abrangendo as regiões env(381-404), env(273-293), env(223-242) e env(176-199) da proteína da membrana envolvente do VLTH-I. A partir dos exemplos

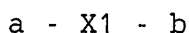
apresentados é de admitir que apenas o peptido A foi útil num protocolo ELISA para a detecção de anticorpos específicos contra o VLTH-I existentes nas amostras testadas.

Nenhum dos ensaios descritos antes demonstrou possuir a elevada especificidade (ausência de falsos positivos) e a elevada sensibilidade (detecção de todos os positivos, mesmo nos casos em que os soros contêm níveis muito fracos de anticorpos contra os VLTH) necessária para garantir que os produtos sanguíneos infectados com os VLTH não entram nos bancos de sangue e que permita que os indivíduos infectados procurem um rápido e imediato tratamento. Os peptidos da presente invenção vêm resolver estas insuficiências.

SUMARIO DA INVENÇÃO

Os peptidos da presente invenção são seleccionados entre o grupo constituído por:

(i) peptidos que possuem a fórmula geral:



em que:

o símbolo X1 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de AA₂₈₃-AA₃₀₉ da proteína gp46 env (VLTH-I) e seus análogos;

o símbolo a representa um terminal amino, entre um e oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar o acoplamento ou para melhorar a actividade imunogénica ou

antigénica do peptido; e

o símbolo b representa um terminal carboxi, entre um e oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar o acoplamento ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica do peptido;

(ii) peptidos que possuem a fórmula geral:

$$a - X2 - b$$

em que:

o símbolo X2 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de AA₂₇₃-AA₃₀₅ da proteína gp46 env (VLTH-II) e seus análogos e os símbolos a e b possuem as significações definidas antes;

(iii) peptidos que possuem a fórmula geral:

$$a - Z1 - b$$

em que:

o símbolo Z1 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de AA₂₃₆-AA₂₅₇ da proteína gag p24 (VLTH-I) e seus análogos e os símbolos a e b possuem as significações definidas antes;

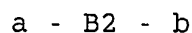
(iv) peptidos que possuem a fórmula geral:

$$a - Z2 - b$$

em que:

o símbolo Z2 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de AA₂₄₂-AA₂₆₃ da proteína gag p24 (VLTH-II) e seus análogos e os símbolos a e b possuem as significações definidas antes;

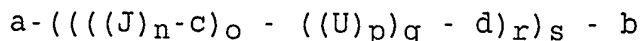
(v) peptidos que possuem a fórmula geral:



em que:

o símbolo B2 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de AA₁₇₁-AA₂₀₇ da proteína gp46 env (VLTH-II) e seus análogos e os símbolos a e b possuem as significações definidas antes; e

(vi) peptidos em tandem que possuem a fórmula geral:



em que:

os símbolos J e U representam sequências de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de sequências seleccionadas independentemente entre o grupo constituído por AA₁₉₃-AA₂₁₀ ou AA₂₈₃-AA₃₀₉ da proteína gp46 env (VLTH-I); AA₂₃₆-AA₂₅₇ da proteína p24 gag (VLTH-I); AA₁₂₀-AA₁₃₀ da proteína p19 gag (VLTH-I); AA₁₇₁-AA₂₀₇ ou AA₂₇₃-AA₃₀₅ da proteína gp46 env (VLTH-II); AA₂₄₂-AA₂₆₃ da proteína p24 gag (VLTH-II e AA₁₂₆-AA₁₃₆ da proteína p19 gag (VLTH-II); e seus

derivados;

os símbolos a e b possuem as significações definidas antes;

os símbolos c e d, se existirem, são seleccionados independentemente entre um e oito aminoácidos ou representam um substituinte eficaz para facilitar o acoplamento ou para aperfeiçoar a actividade imunogénica ou antigénica do peptido;

n = 1-5;

o = 1-5 se c existir, caso contrário o=1;

p = 1-5;

q = 1-5;

r = 1-5 se d existir, caso contrário r=1; e

s = 1-5.

Os peptidos e correspondentes misturas da presente invenção são úteis para efectuar a despistagem de sangue e de fluídos corporais no que diz respeito à presença dos VLTH-I e VLTH-II e para a preparação de vacinas seguras e eficazes contra as infecções dos VLTH-I e VLTH-II. Por exemplo, os peptidos da presente invenção e suas misturas são úteis numa ampla variedade de ensaios de ligação específicos para a detecção de anticorpos contra os VLTH-I e VLTH-II, como imunogenes para eliciar anticorpos para a detecção dos antígenos dos VLTH-I e VLTH-II e para a preparação de vacinas

contra as infecções virais dos VLTH-I e VLTH-II.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 representa a sequência dos aminoácidos dos produtos do gene *env* (gp46 e gp21) do VLTH-I e VLTH-II. Os resíduos aminoácidos da sequência são apresentados utilizando-se o seguinte código de letras: A=ala, C=cys, D=asp, E=glu, F=phe, G=gly, H=his, I=ile, K=lys, L=leu, M=met, N=asn, P=pro, Q=gln, R=arg, S=ser, T=thr, V=val, W=trp, Y=tyr. Os "..." são espaços que foram adicionados de modo a permitir alinhar as sequências indicadas da melhor forma possível.

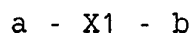
A Figura 2 representa a sequência de aminoácidos dos produtos do gene *gag* dos VLTH-I e VLTH-II. Novamente se afirma que os "..." são espaços que foram adicionados de modo a permitir alinhar as sequências indicadas da melhor forma possível.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona novos peptídeos e seus análogos correspondentes às regiões imunodominantes dos produtos do gene *env* e do gene *gag* dos VLTH-I e VLTH-II. Proporciona também misturas e combinações químicas desses peptídeos e análogos. Conforme se torna evidente a partir da descrição seguinte, esses peptídeos, análogos, misturas e combinações químicas são úteis numa ampla variedade de métodos de diagnóstico e métodos preventivos, em meios e em composições que tenham qualquer relação com os VLTH-I e VLTH-II e no caso de infecções provocadas por esses vírus. Alguns desses peptídeos, análogos, misturas e combinações químicas da presente invenção também são capazes de distinguir

qual o vírus, VLTH-I ou VLTH-II, com que um paciente particular está infectado. Conforme especificado antes, os peptidos da presente invenção são seleccionados entre o grupo constituído por:

(i) peptidos que possuem a fórmula geral:



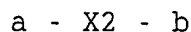
em que:

o símbolo X1 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de AA₂₈₃-AA₃₀₉ da proteína gp46 env (VLTH-I) e seus análogos;

o símbolo a representa um terminal amino, entre um e oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar o acoplamento ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica do peptido; e

o símbolo b representa um terminal carboxi, entre um e oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar o acoplamento ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica do peptido;

(ii) peptidos que possuem a fórmula geral:



em que:

o símbolo X2 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de AA₂₇₃-AA₃₀₅ da

proteína gp46 env (VLTH-II) e seus análogos e os símbolos a e b possuem as significações definidas antes;

(iii) peptidos que possuem a fórmula geral:

$$a - Z1 - b$$

em que:

o símbolo Z1 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de AA₂₃₆-AA₂₅₇ da proteína gag p24 (VLTH-I) e seus análogos e os símbolos a e b possuem as significações definidas antes;

(iv) peptidos que possuem a fórmula geral:

$$a - Z2 - b$$

em que:

o símbolo Z2 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de AA₂₄₂-AA₂₆₃ da proteína gag p24 (VLTH-II) e seus análogos e os símbolos a e b possuem as significações definidas antes;

(v) peptidos que possuem a fórmula geral:

$$a - B2 - b$$

em que:

o símbolo B2 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de AA₁₇₁-AA₂₀₇ da

proteína gp46 env (VLTH-II) e seus análogos e os símbolos a e b possuem as significações definidas antes; e

(vi) peptidos em tandem que possuem a fórmula geral:

$$a-(((J)_n-c)_o - ((U)_p)_q - d)_r)_s - b$$

em que:

os símbolos J e U representam sequências de pelo menos seis aminoácidos extraídos em bloco de sequências seleccionadas independentemente entre o grupo constituído por AA₁₉₃-AA₂₁₀ ou AA₂₈₃-AA₃₀₉ da proteína gp46 env (VLTH-I); AA₂₃₆-AA₂₅₇ da proteína p24 gag (VLTH-I); AA₁₂₀-AA₁₃₀ da proteína p19 gag (VLTH-I); AA₁₇₁-AA₂₀₇ ou AA₂₇₃-AA₃₀₅ da proteína gp46 env (VLTH-II); AA₂₄₂-AA₂₆₃ da proteína p24 gag (VLTH-II) e AA₁₂₆-AA₁₃₆ da proteína p19 gag (VLTH-II); e seus derivados;

os símbolos a e b possuem as significações definidas antes;

os símbolos c e d, se existirem, são seleccionados independentemente entre um e oito aminoácidos ou representam um substituinte eficaz para facilitar o acoplamento ou para aperfeiçoar a actividade imunogénica ou antigénica do peptido;

$$n = 1-5;$$

$$o = 1-5 \text{ se } c \text{ existir, caso contrário } o=1;$$

p = 1-5;

q = 1-5;

r = 1-5 se d existir, caso contrário r=1; e

s = 1-5.

O termo agora utilizado "análogos" significa inserções, supressões, substituições e modificações de aminoácidos em um ou vários sítios da cadeia peptídica na sua porção que é constituída pelo bloco das sequências dos aminoácidos dos VLTH-I ou VLTH-II que ocorrem naturalmente.

As modificações e substituições preferenciais das sequências dos aminoácidos nativos dos peptídeos da presente invenção são de tipo conservativo (isto é, implicam uma influência mínima sobre a estrutura secundária e sobre a natureza hidropática do peptido). Estão nesse caso as substituições do tipo descrito por Dayhoff em Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978 e por Argos em EMBO J. 8, 779-785, 1989. Por exemplo, os aminoácidos pertencentes a um dos grupos a seguir indicados representam modificações de tipo conservativo: ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; cys, ser, tyr, thr; val, ile, leu, met, ala, phe; lys, arg, his; e phe, tyr, trp, his. De modo idêntico, a metionina, que é um aminoácido propenso a oxidação pode ser substituído por norleucina. As substituições preferenciais englobam também as substituições dos isómeros D para proporcionar os correspondentes L-aminoácidos.

Todavia, conforme descrito antes, independentemente dessas inserções, supressões, substituições

e modificações, os peptidos da presente invenção devem conter pelo menos 6 aminoácidos extraídos em bloco do grupo seguinte: AA₂₈₃-AA₃₀₉ da proteína gp46 env (VLTH-I); AA₂₇₃-AA₃₀₅ do produto gp46 do gene env (VLTH-II); AA₂₃₆-AA₂₅₇ do produto p24 da proteína gag (VLTH-I); AA₂₄₂-AA₂₆₃ do produto p24 da proteína gag (VLTH-II); e AA₁₇₁-AA₂₀₇ do produto gp46 da proteína env (VLTH-II). De modo idêntico, os peptidos em tandem da presente invenção devem conter pelo menos 6 aminoácidos extraídos em bloco do grupo J e U conforme descrito antes.

De preferência, nas fórmulas dos peptidos da presente invenção, as sequências dos blocos X1, X2, Z1, Z2, B2, J e U são sequências de pelo menos 10 aminoácidos. Mais preferencialmente, são sequências contendo pelo menos 15 aminoácidos. Ainda mais preferencialmente são sequências de pelo menos 20 aminoácidos e muito mais preferencialmente são sequências de pelo menos 25 aminoácidos. De preferência, no peptido em tandem da fórmula da presente invenção, os símbolos, n, o, p, q, r e s = 1-3. Mais preferencialmente, n, o, p, q, r e s = 1-2.

O termo "aminoácido" utilizado na presente memória descritiva (por exemplo, na definição dos símbolos a e b), excepto quando se refere à sequência dos aminoácidos dos produtos génicos dos VLTH-I ou VLTH-II, abrange todos os aminoácidos naturais, os aminoácidos que possuam a configuração D e os aminoácidos modificados, não nativos, sintéticos e conhecidos tais como a homocisteína, a ornitina, a norleucina e a β -valina.

O termo "bloco" agora utilizado refere-se a uma sequência de aminoácidos idêntica à que existe no polipeptido

nativo dos VLTH-I ou VLTH-II.

Conforme evidenciado no alínea (vi) anterior, faz parte do âmbito da presente invenção a utilização de peptídeos em tandem. Esses peptídeos podem ser homopolímeros, copolímeros ou multímeros. Descobriu-se inesperadamente que esses peptídeos em tandem demonstram um grau de reactividade muito elevado para os anticorpos contra os VLTH. Considera-se também do âmbito da presente invenção as misturas físicas dos peptídeos da presente invenção com os peptídeos em tandem referidos antes.

Como exemplo ilustrativo dos peptídeos da presente invenção que derivam da gp46 do gene *env* do VLTH-I refere-se:

BCH-416 a-AIVSSPSHNSLILPPFSLSPVPTLGSR-b *env*(283-309)

em que o resíduo cisteína na posição 289 foi substituído por um resíduo serina e em que os símbolos a e b possuem as significações definidas antes.

Como exemplos ilustrativos dos peptídeos da presente invenção derivados da gp46 do gene *env* do VLTH-II referem-se:

BCH-219 a-LVHDSLEHVLTPSTSWTTKIL-b *env*(186-207)

BCH-404 a-TTDNSNNSIILPPFSLAPV-b *env*(281-299)

BCH-407 a-YQRLQAITTDNSNNSIILPPFSLAPV-b *env*(273-299)

BCH-418 a-TTDNSNNSIILPPFSLAPVPPPATR-b *env*(281-305)

BCH-447 a-FITSEPTQPPPTSPPLVHDSLEHVLTPSTS-b *env*(171-201)

BCH-486 a-TSEPTQPPPTSPPLVHDSLEHVL-b *env*(173-196)

BCH-456 a-TSEPTQPPPTSPPLLHDSLEHVL-b *env*(173-186-L-187-196)

em que os símbolos a e b possuem as significações definidas antes.

Como exemplo ilustrativo dos peptidos da presente invenção derivados da p24 do gene gag do VLTH-I refere-se:

BCH-411 a-QQGLRREYQQWLAAFAALPGS-b gag(236-257)

em que os símbolos a e b possuem as significações definidas antes.

Como exemplo ilustrativo dos peptidos derivados da p24 do gene gag do VLTH-I refere-se:

BCH-412 a-QQGLRREYQNLWLAASFSTLPGN-b gag(242-263)

em que os símbolos a e b possuem as significações definidas antes.

Os peptidos em tandem preferenciais da presente invenção são definidos pela fórmula geral :

a - J - c - U - b

em que os símbolos a, b, c, J e U possuem as significações definidas antes. Mais preferencialmente um dos grupos J e U é seleccionado a partir de um peptido de VLTH-I e o outro é seleccionado a partir de um peptido de VLTH-II. Como exemplo ilustrativo desses peptidos em tandem preferenciais refere-se:

BCH-234 a-PHSNLDHILEPSIPWKSHPYVEPTAPQVL-b

em que:

o símbolo J representa BCH-152 (HSNLDHILEPSIPWKSKL) (derivado do gene env do VLTH-I: env (193-210)) ao qual foi adicionado o resíduo Pro no terminal N (a) e do qual se removeu um resíduo Leu do terminal C, não estando presente o grupo representado por c e em que U representa BCH-228 (PYVEPTAPQVL) (derivado do gene gag do VLTH-I: gag (120-130), os últimos 11 aminoácidos da p19 (Figura 2)).

Os peptídeos preferenciais da presente invenção são os peptídeos BCH-219, BCH-407, BCH-416, BCH-418, BCH-447, BCH-456, BCH-486 e o peptídeo em tandem BCH-234. Os peptídeos mais preferenciais da presente invenção são os peptídeos BCH-416, BCH-456, BCH-486 e BCH-234. A mistura de peptídeos preferencial da presente invenção contém pelo menos o peptídeo BCH-416. Mais preferencialmente contém pelo menos os peptídeos BCH-416 e BCH-234 e ainda mais preferencialmente contém pelo menos os peptídeos BCH-416, BCH-234 e BCH-456.

Para além da sua utilização em meios, métodos e composições de diagnóstico dos VLTH-I e II, os peptídeos da presente invenção também podem ser utilizados para distinguir entre uma infecção de VLTH-I e uma infecção de VLTH-II. Essa distinção de diagnóstico efectua-se, por exemplo, testando a amostra separadamente com um peptídeo da presente invenção derivado de VLTH-I, ou com uma sua mistura com outros peptídeos de VLTH-I e com um peptídeo da presente invenção derivado de VLTH-II ou com uma sua mistura com outros peptídeos de VLTH-II e determinando qual dos peptídeos reage mais fortemente. Os peptídeos preferenciais para esses métodos são o BCH-234 para a identificação de uma infecção de VLTH-I e os BCH-456 e BCH-486 para a identificação de uma infecção de VLTH-II.

Os peptidos da presente invenção e suas misturas também são úteis para a preparação de vacinas contra infecções dos VLTH. As titulações dos anticorpos contra os VLTH-I e II são extraordinariamente fracas indicando esse facto que esses vírus não são muito imunogénicos ou que suportam epítopes imunossupressores que amortecem a resposta imune normal. Em consequência, a utilização de peptidos sintéticos que simulam apenas os epítopes responsáveis pela indução dos anticorpos neutralizadores pode ser eventualmente valiosa no desenvolvimento de possíveis vacinas sintéticas. Por esse motivo é também do âmbito da presente invenção a utilização desses peptidos em vacinas contra infecções de VLTH-I e de VLTH-II.

Uma vantagem inesperada dos peptidos e das misturas da presente invenção é a sua elevada sensibilidade. São capazes de detectar os anticorpos específicos dos VLTH-I e II na maioria e frequentemente em todas as amostras seropositivas confirmadas que fazem parte de um painel comercial vendido para a avaliação do desempenho dos estojos anti-VLTH-I/II. Outra vantagem dos peptidos e das misturas da presente invenção é o seu alto nível de especificidade - originam apenas um número mínimo de falsos positivos. Por exemplo, utilizando a mistura de peptidos descrita antes (BCH-219, BCH-234 e BCH-416) não foram detectados quaisquer falsos positivos quando se efectuou o teste de 150 amostras extraídas de uma população doadora de sangue normal. Além disso, a relação média da D.O. registada para o valor de transição foi igual a 0,25 para essas amostras negativas.

Conforme anteriormente especificado de modo sucinto, é frequentemente útil e garantidamente do âmbito da presente invenção modificar os peptidos desta invenção com o

objectivo de fazer com que o peptido seleccionado seja mais útil como reagente de imunodiagnóstico ou como um ingrediente activo de uma vacina. Essas modificações englobam, por exemplo:

- a adição de um resíduo cisteína a um ou aos dois terminais com o objectivo de facilitar o acoplamento do peptido a um veículo adequado, com reagentes de interligação heterobifuncionais tais como o composto butirato de sulfossuccinimidil-4-(p-maleimido-fenilo) sendo reagentes preferenciais para efectuar essas ligações os compostos ciclo-hexano-1-carboxilato de sulfossuccinimidil-4-sulfossuccinimidil-4-(N-maleimido-metilo) e o propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio);

- a adição de 1 a 8 aminoácidos em um ou nos dois terminais do peptido para facilitar a união dos peptidos uns aos outros, para o acoplamento a um suporte ou a um peptido maior ou a uma proteína ou para a modificação das propriedades físicas ou químicas do peptido. Como exemplos dessas modificações refere-se a adição de tirosina, ácido glutâmico ou ácido aspártico ao terminal N ou ao terminal C como ligadores através de uma reacção de esterificação e ainda a lisina a qual pode ser ligada através da formação de uma amida ou de uma base de Schiff. Conforme descrito antes esses aminoácidos adicionais podem ser seleccionados entre quaisquer aminoácidos naturais, entre os aminoácidos nas suas configurações D e entre aminoácidos sintéticos e modificados, não nativos conhecidos; e

- a transformação de um ou de ambos os terminais do peptido, por exemplo, por acilação ou por amidação. Essas modificações originam alterações na carga líquida sobre o

peptido e também podem facilitar a união covalente do peptido a um suporte sólido, a uma veículo ou a outro peptido. Como exemplos dos substituintes eficazes para facilitar o acoplamento ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica do peptido refere-se os grupos acilo(C₂-C₁₆), o polietileno-glicol e os fosfolipidos.

Para a preparação dos novos peptidos da presente invenção é possível utilizar eventualmente qualquer das metodologias convencionais para a produção de peptidos. Entre essas metodologias refere-se a síntese, a tecnologia do ADN recombinante e suas combinações. Considera-se preferencial a síntese em fase sólida. Neste tipo de abordagem sintética, o suporte de resina pode ser constituído por qualquer resina adequada convencionalmente utilizada na especialidade para a preparação de peptidos em fase sólida. De preferência essa resina é uma resina de p-benziloxiálcool-polistireno ou p-metil-benzidrila-amina. Após o acoplamento do primeiro aminoácido protegido ao suporte de resina procede-se à remoção do grupo de protecção amino por métodos normalizados convencionalmente utilizados na especialidade. Após a remoção do grupo de protecção amino efectua-se o acoplamento dos restantes aminoácidos protegidos e, se necessário, dos aminoácidos protegidos da cadeia lateral, de modo sequencial e segundo a ordem desejada para proporcionar o peptido pretendido. Em alternativa é possível eventualmente acoplar grupos múltiplos de aminoácidos utilizando a metodologia de tipo solução antes de se efectuar o acoplamento com a sequência de aminoácidos suportados na resina.

A selecção de um reagente de acoplamento adequado é efectuada de acordo com os preceitos estabelecidos na especialidade. Por exemplo, considera-se como reagentes de

acoplamento adequados os compostos N,N'-di-isopropil-carbo-di-imida ou N,N'-diciclo-hexil-carbo-di-imida (DCC), ou hexafluoro-fosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfónio utilizados isoladamente ou de preferência em presença de 1-hidroxibenzotriazol. Outro procedimento de acoplamento útil recorre à utilização de anidridos simétricos pré-formados dos aminoácidos protegidos.

O necessário grupo de protecção α -amino utilizado para introduzir cada aminoácido na cadeia do polipeptido em crescimento é de preferência o grupo 9-fluorenil-metiloxicarbonilo (Fmoc), embora possam ser eventualmente utilizados quaisquer outros grupos de protecção adequados desde que não sofram degradação sob as condições de acoplamento e desde que sejam facilmente removíveis de modo selectivo em presença de outro grupo de protecção que já exista na cadeia do peptido em crescimento.

Os critérios para a selecção dos grupos de protecção dos aminoácidos da cadeia lateral são: (a) estabilidade do grupo de protecção em presença dos diversos reagentes sob as condições de reacção selectivas para a remoção do grupo de protecção α -amino em cada passo da síntese; (b) retenção das propriedades estratégicas dos grupos de protecção (isto é, não serem cindidos sob as condições de acoplamento) e (c) possibilidade de remoção fácil do grupo de protecção ao concluir-se a síntese do peptido e sob condições que de nenhuma forma afectem a estrutura do peptido.

Os peptidos suportados em resina e totalmente protegidos são clivados preferencialmente a partir da resina de p-benziloxi-álcool com uma solução entre 50 a 60% de ácido trifluoro-acético em cloreto de metileno durante um período de

tempo compreendido entre 1 e 6 horas à temperatura ambiente e em presença de purificadores adequados tais como o anisol, o tioanisol, o sulfureto de etil-metilo, o 1,2-etano-ditíol e reagentes afins. Simultaneamente efectua-se a remoção dos grupos de protecção da cadeia lateral mais instáveis aos ácidos. Os grupos de protecção mais resistentes aos ácidos são removidos tipicamente por tratamento com HF.

Os peptidos da presente invenção são úteis como reagentes de diagnóstico para a detecção e para a quantificação dos anticorpos associados ao VLTH-I e ao VLTH-II em conformidade com métodos bem conhecidos na especialidade. Como exemplos desses métodos e ensaios refere-se o protocolo ELISA, o método da hemaglutinação, o método do ponto único e o método dos pontos múltiplos.

Uma técnica preferencial conveniente e clássica para a determinação dos anticorpos contra o VLTH-I e contra o VLTH-II utilizando um peptido ou uma mistura de peptidos da presente invenção é um ensaio de imunoadsorvência ligada à enzima (ELISA). De acordo com este ensaio, por exemplo, faz-se adsorver um peptido ou uma mistura de peptidos da presente invenção ou efectua-se o acoplamento de tipo covalente, sobre as cavidades de uma placa de microtitulação. Essas cavidades são depois tratadas com os soros ou com as amostras analíticas que se pretende testar. Após a lavagem adiciona-se a essas cavidades anti-IgG humana ou anti-IgM humana marcada com peroxidase. A determinação da peroxidase é efectuada com um substrato correspondente, por exemplo, 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina. Sem que haja afastamento relativamente à utilidade deste ensaio ilustrativo, afirma-se que a peroxidase pode ser substituída por outra marca identificadora, por exemplo, por uma marca radioactiva, fluorescente, quimioluminescente ou

emissora de infra-vermelhos.

Outro método para a determinação dos anticorpos contra o VLTH-I e contra o VLTH-II com os peptidos ou com as misturas de peptidos da presente invenção consiste em recorrer a um teste imunológico enzimático de acordo com o designado "Ensaio da Dupla Sanduíche de Antígenos". Este método baseia-se no trabalho de Maiolini tal como descrito em "Immunological Methods 20, 25-34 (1978)". De acordo com este método faz-se contactar o soro ou qualquer outra amostra analítica que se pretende testar, com uma fase sólida revestida com o peptido da presente invenção (camada de captura) e com um peptido da presente invenção que tenha sido marcado com peroxidase ou com outra marca identificadora (camada sonda).

A reacção imunológica pode ser efectuada em 2 passos. No caso de a reacção imunológica ser efectuada em 2 passos, então efectua-se tipicamente um passo de lavagem entre as duas incubações. Após a reacção ou reacções imunológicas efectua-se normalmente também um passo de lavagem. A seguir determina-se a peroxidase ou o outro sinal, por exemplo, utilizando o composto com o-fenileno-diamina para a peroxidase. Neste ensaio também é possível utilizar eventualmente outras enzimas e cromogéneos incluindo os que foram já descritos.

As fases sólidas adequadas para utilização nos ensaios e nos métodos de ensaio descritos antes englobam os polímeros orgânicos e inorgânicos, por exemplo, as amilases, os dextranos, as celulosas naturais ou modificadas, o polietileno, o polistireno, as poliacrilamidas, as geloselas, a magnetite, o pó de vidro poroso, o fluoreto de polivinildieno

(kynar) e o latex, as paredes internas dos recipientes de ensaio (isto é, tubos de ensaio, placas de titulação ou cadinhos de vidro ou de qualquer material artificial) e também a superfície de corpos sólidos (isto é, varetas de vidro e de qualquer material artificial, varetas com um terminal mais grosso, varetas com lobos ou lamelas terminais). As esferas de vidro e de materiais artificiais são especialmente adequadas como veículos de fase sólida.

Os peptidos e as misturas de peptidos da presente invenção são úteis não só para a determinação e para a quantificação dos anticorpos contra o VLTH-I e contra o VLTH-II como também são úteis para a determinação e para a quantificação dos próprios antígenos de VLTH-I e VLTH-II uma vez que os peptidos da presente invenção, quer no estado livre, polimerizados ou conjugados com um veículo adequado, são úteis para eliciar os anticorpos, em particular e preferencialmente os anticorpos monoclonais, imunologicamente interreactivos para os antígenos do VLTH-I e do VLTH-II. Esses anticorpos podem ser produzidos, por exemplo, injectando um mamífero ou uma ave com uma quantidade suficiente do peptido para eliciar a resposta imune desejada e recolhendo esses anticorpos a partir do soro dos referidos animais. Os animais adequados como hospedeiros para eliciar os anticorpos englobam, por exemplo, os coelhos, os equinos, os caprinos, as cobaias, os ratos, os murganhos, os bovinos, os ovídeos e a aves. De preferência os hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais desejados são preparados utilizando os peptidos da presente invenção e técnicas convencionais.

Por exemplo, é possível utilizar eventualmente a técnica bem conhecida de Kohler e Milstein para a produção de anticorpos monoclonais. Com o objectivo de se distinguir os

anticorpos monoclonais que são dirigidos contra o mesmo antígeno mas contra epítopes diferentes, é possível utilizar o método de Stahli e seus colaboradores (J. of Immunological Methods, 32, 297-304, 1980).

Podem ser utilizados diversos métodos que são geralmente conhecidos para a determinação ou para a quantificação do VLTH-I e do VLTH-II ou de uma sua porção utilizando os anticorpos referidos antes. De acordo com um desses procedimentos mistura-se conjuntamente quantidades conhecidas de uma amostra do soro ou de outra amostra analítica que se pretende ensaiar, um peptido ou uma mistura de peptidos radioidentificados da presente invenção e um peptido ou uma mistura de peptidos não marcados da presente invenção, adiciona-se uma determinada quantidade de um anticorpo anti-peptido, de preferência um anticorpo monoclonal e deixa-se a mistura em repouso. Depois separa-se o complexo anticorpo/antígeno resultante dos reagentes não ligados por procedimentos conhecidos na especialidade, isto é, por tratamento com sulfato de amônio, polietileno-glicol, um segundo anticorpo em excesso ou ligado a um suporte insolúvel ou carvão coberto com dextrano. Depois determina-se a concentração do peptido marcado na fase ligada ou na fase não ligada e determina-se o conteúdo em antígeno de VLTH-I ou VLTH-II da referida amostra comparando o nível de componente marcado com uma curva normalizada, por um processo conhecido de per si.

Outro método adequado para a utilização desses anticorpos em ensaios é conhecido pela designação de "Ensaio da Dupla Sanduíche de Anticorpos". De acordo com este ensaio trata-se a amostra que se pretende testar com dois anticorpos diferentes, por exemplo, desenvolvidos por imunização de

animais diferentes, por exemplo, ovídeos e coelhos, com um peptido ou com uma mistura de peptidos da presente invenção. Um dos anticorpos é marcado e o outro serve para cobrir a fase sólida. A fase sólida preferencial é constituída por pequenas esferas de plástico e a marca identificadora preferencial é a peroxidase do rábano.

Tipicamente, no processo "Ensaio da Dupla Sanduíche de Anticorpos" efectua-se a incubação da amostra com o anticorpos em fase sólida e com o anticorpo marcado. Todavia também é possível fazer contactar a amostra primeiro com o anticorpo em fase sólida e depois, após uma lavagem facultativa, fazer contactar a amostra com o anticorpo marcado. Todavia, é preferível tratar a amostra simultaneamente com o anticorpo em fase sólida e com o anticorpo marcado. Após as reacções imunológicas lava-se a mistura e determina-se a marca identificadora de acordo com procedimentos bem conhecidos na especialidade. No caso de se utilizar peroxidase como marca identificadora, a determinação pode ser efectuada utilizando um substrato, por exemplo, utilizando o-fenileno-diamina ou utilizando tetrametil-benzidina. A quantidade de componente marcado é proporcional à quantidade dos antígenos existentes na amostra analítica ou na amostra de soro.

Os métodos e os ensaios para a determinação e para a quantificação dos antígenos de VLTH-I e VLTH-II ou dos anticorpos contra esses vírus, tal como descrito antes, podem também ser efectuados com estojos de ensaio adequados caracterizados por incorporarem um peptido ou uma mistura de peptidos da presente invenção, ou anticorpos contra o VLTH-I ou contra o VLTH-II eliciados por esses peptidos e misturas

Conforme descrito antes, os peptídeos e misturas da presente invenção também são úteis como componentes activos de vacinas capazes de induzirem imunidade protectora contra o VLTH-I e contra o VLTH-II em hospedeiros susceptíveis de virem a ser infectados com esses vírus. As vias de administração, as doses de antígenos, o número e a frequência de injecções variaram de indivíduo para indivíduo e são semelhantes às que actualmente estão a ser utilizadas para proporcionar imunidade para outras infecções virais. Por exemplo, as vacinas da presente invenção são composições farmacêuticamente aceitáveis que contêm pelo menos um peptídeo ou uma mistura da presente invenção numa quantidade eficaz de tal modo que um mamífero, incluindo um ser humano, tratado com essa composição desenvolve anticorpos suficientes que permitem proteger o animal tratado contra uma infecção de VLTH-I ou de VLTH-II durante um determinado período de tempo.

Essas vacinas são preparadas de acordo com métodos conhecidos. As composições que constituem vacinas da presente invenção podem conveniente e convencionalmente ser combinadas com substâncias que constituem veículos fisiologicamente aceitáveis tais como as soluções salinas de qualidade farmacêutica, a anatoxina do tétano e a hemocianina dos moluscos gastrópodes. As composições que constituem vacinas da presente invenção que podem conter também eventualmente adjuvantes ou outros agentes que aumentem a resposta imune tais como as preparações de alúmen, os lipossomas ou os agentes imunomoduladores. Além disso, essas composições que constituem vacinas podem incorporar outros antígenos para proporcionar imunidade contra outros vírus (por exemplo, VIH-1, VIH-2, citomegalovírus) ou patogéneos para além da imunidade contra os VLTH-I e VLTH-II. A quantidade desses antígenos diferentes está também dependente do mamífero

que se pretende tratar e do estado da doença. Contudo, o antígeno deve estar presente numa quantidade eficaz que permita desenvolver anticorpos suficientes que protegerem o mamífero tratado contra o agente patogénico ou contra o vírus durante um determinado período de tempo.

Os procedimentos gerais para a síntese e para a utilização dos peptidos da presente invenção são descritos a seguir.

Procedimento 1: Preparação de Resinas que Suportam o Resíduo Aminoácido Protegido por N-FMOC

Preparou-se o desejado resíduo aminoácido protegido por N-FMOC numa mistura de cloreto de metileno (CH_2Cl_2) e de dimetilformamida (DMF) (4:1) e adicionou-se a uma suspensão de resina de p-benziloxi-álcool numa mistura de CH_2Cl_2 :DMF (4:1) à temperatura de 0°C . Agitou-se a mistura manualmente durante alguns segundos e depois tratou-se com N,N'-diciclo-hexil-carbo-di-imida (DCC) seguindo-se o tratamento com uma quantidade catalítica de 4-(dimetilamino)-piridina. Agitou-se a mistura à temperatura de 0°C durante mais 30 minutos e depois agitou-se à temperatura ambiente durante a noite. Lavou-se a resina filtrada sucessivamente com CH_2Cl_2 , DMF e isopropanol (3 lavagens de cada vez) e finalmente com CH_2Cl_2 . Com a resina preparou-se uma suspensão em CH_2Cl_2 , arrefeceu-se em banho de gelo e adicionou-se piridina bidestilada à suspensão agitada seguindo-se a adição de cloreto de benzoilo. Manteve-se a agitação à temperatura de 0°C durante 30 minutos e depois à temperatura ambiente durante 60 minutos. Após a filtração lavou-se a resina sucessivamente com CH_2Cl_2 , DMF e isopropanol (3 lavagens de cada vez) e finalmente com éter do petróleo (2 vezes) antes de

se proceder à secagem sob vácuo intenso até se obter um peso constante.

A determinação espectrofotométrica da substituição de acordo com Meienhofer e colaboradores (Int. J. Peptide Protein Res., 13, 35, 1979) indica o grau de substituição na resina.

Procedimento 2: Acoplamento dos Aminoácidos Subsequentes

Colocou-se a resina que suporta o primeiro aminoácido protegido por N-FMOC num vaso de reacção de um sintetizador de peptidos de tipo "Biosearch 9600" e tratou-se conforme se descreve a seguir:

- 1) Lavagem com DMF (4 vezes durante 20 segundos de cada vez)
- 2) Pré-lavagem com uma solução a 30% de piperidina em DMF (3 minutos)
- 3) Desprotecção com uma solução a 30% de piperidina em DMF (7 minutos)
- 4) Lavagem com DMF (8 vezes durante 20 segundos de cada vez)
- 5) Verificação para confirmação dos grupos amino livre - Teste de Kaiser (deve ser positivo)
- 6) Depois agitou-se a resina dos peptidos

suavemente durante 1 ou 2 horas com 8 equivalentes do desejado aminoácido protegido por FMOC e com 1-hidroxi-benzotriazol e hexafluoro-fosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetil-amino)fosfónio estando estes componentes todos dissolvidos em DMF bidestilada e anidra contendo 16 equivalentes de 4-metil-morfolina.

- 7) Lavagem com DMF (6 vezes durante 20 segundos de cada vez).

Após o passo 7 retirou-se uma aliquota para o teste da ninidrina. Se esse teste for negativo regressa-se ao passo 1 para o acoplamento do aminoácido seguinte. Se o teste for positivo ou ligeiramente positivo é necessário repetir os passos 6 e 7.

O esquema anterior pode ser utilizado para o acoplamento de cada um dos aminoácidos dos peptidos descritos na presente invenção. Também se pode recorrer eventualmente à protecção de tipo N-FMOC com cada um dos aminoácidos restantes ao longo de toda a síntese.

Os peptidos radioidentificados podem ser preparados por incorporação de um aminoácidos tritiado utilizando o protocolo de acoplamento anterior.

Após a adição do último aminoácido procede-se à remoção do grupo N-FMOC do resíduo do terminal N repetindo os passos 1-7 do esquema anterior. Lava-se a resina que suporta o peptido com CH_2Cl_2 e efectua-se a secagem no vácuo para proporcionar o peptido protegido impuro.

Procedimento 3: Desprotecção e Clivagem dos Peptidos a Partir da Resina

Com a resina do peptido protegido preparou-se uma suspensão numa solução a 55% de ácido trifluoro-acético (TFA) em CH_2Cl_2 contendo 2,5% de etano-ditiol e 2,5% de anisol. Limpou-se a mistura com azoto e agitou-se durante 1,5 horas à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura e lavou-se a resina com CH_2Cl_2 . Tratou-se a resina novamente com uma solução de 20% de TFA em CH_2Cl_2 durante 5 minutos à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura e lavou-se a resina com uma solução de TFA a 20% em CH_2Cl_2 e depois lavou-se com CH_2Cl_2 . Evaporou-se no vácuo os filtrados combinados a uma temperatura inferior a 35°C e triturou-se o resíduo várias vezes com éter dimetílico seco. Dissolveu-se o sólido numa solução aquosa a 10% de ácido acético e liofilizou-se para proporcionar o produto impuro.

Os peptidos que continham os resíduos arg e cys foram ainda desprotegidos por tratamento com HF à temperatura de 0°C durante 1 hora em presença de anisol e de sulfureto de dimetilo. Efectuou-se a extracção dos peptidos com uma solução aquosa de ácido acético a 10%, lavou-se com éter dimetílico e liofilizou-se para proporcionar os peptidos impuros.

Procedimento 4: Purificação dos Peptidos

Efectuou-se a purificação dos peptidos impuros por cromatografia em líquido de alto rendimento (CLER) preparatória numa coluna "Vydac" (2,5 x 25 mm) de fase inversa C_{18} ou C_4 com um gradiente da fase móvel. Verificou-se o efluente a 220 nm e subsequentemente por CLER analítica.

Juntou-se as fracções relevantes, evaporou-se e liofilizou-se. Verificou-se a identidade dos peptidos sintéticos por cromatografia de fase inversa analítica e por análise dos aminoácidos.

Procedimento 5: Conjugação dos Peptidos com Albomina do
Soro de Bovino (ASB) ou com Hemocianina de Moluscos
Gastrópodes (HMG)

Os peptidos foram conjugados com ASB ou com HMG previamente transformadas com butirato de sulfossuccinimidil-4-(p-maleimidofenilo) (Sulfo-SMPB) ou com ciclo-hexa-
no-1-
-carboxilato de sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil) (Sulfo-SMCC).

Adicionou-se uma solução aquosa de sulfo-SMPB ou sulfo-SMCC (Pierce Chemicals) a uma solução de ASB ou HMG em tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 7,0). Agitou-se a mistura à temperatura ambiente durante 45 minutos e aplicou-se imediatamente o veículo activado a uma coluna de "Sephadex G-25" equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0) à temperatura de 4°C.

As fracções do primeiro pico de absorvência (280 nm) correspondentes ao veículo activado foram combinadas num balão de fundo redondo no qual se introduziu uma solução do peptido em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 6,2). Purificou-se a mistura muito bem com azoto e incubou-se durante a noite à temperatura ambiente. Verificou-se a eficiência do acoplamento utilizando um peptido marcado com ^3H e por análise dos aminoácidos do conjugado.

Procedimento 6: Detecção dos Anticorpos Contra os VLTH-I ou VLTH-II Através de um Ensaio de Imunoabsorvência Ligada à Enzima (ELISA)

Saturou-se cada cavidade da placa de microtitulação com 100 µl de uma solução contendo um peptido ou uma mistura de peptidos (10 µg/ml) e deixou-se em repouso durante a noite. Procedeu-se ao esvaziamento das cavidades e lavou-se 2 vezes com uma solução tampão de lavagem (Tris, 0,043M; NaCl, 0,5M; timerosal, 0,01% p/v; Tween 20, 0,05% v/v; pH 7,4). Depois efectuou-se a saturação das cavidades com 0,35 ml de tampão de lavagem durante 1 hora à temperatura de 37°C e lavou-se uma vez com a mesma solução tampão. As amostras de soro que se pretendia analisar foram diluídas com a solução tampão da amostra (solução tampão de lavagem mais caseína, 0,05% p/v). Enxaguou-se as cavidades com solução tampão de lavagem antes da adição da amostra de soro diluída (0,1 ml). Deixou-se em repouso para se efectuar a incubação durante 1 hora à temperatura ambiente. A seguir esvaziou-se as cavidades, lavou-se duas vezes rapidamente e depois uma vez durante dois minutos com a solução tampão de lavagem. Diluiu-se a solução do conjugado (anticorpo da IgG humana ou da IgM conjugado na cabra e purificado por afinidade e marcado com peroxidase, 0,5 mg em 5 ml de glicerol a 50%) com uma solução a 1% p/v de albumina de soro de bovino em tampão de lavagem e adicionou-se a cada cavidade (0,1 ml) e deixou-se incubar durante 1 hora à temperatura ambiente. A seguir procedeu-se ao esvaziamento das cavidades e lavou-se cinco vezes com solução tampão de lavagem. Diluiu-se a solução do substrato (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina, 8 mg por ml de DMSO) com 100 volumes de tampão acetato/citrato 0,1 M, (pH 5,6), contendo 0,1% v/v de H₂O₂ a 30% e adicionou-se a cada cavidade (0,1 ml por cavidade). Decorridos 30 minutos tratou-se os conteúdos

de cada cavidade com 0,1 ml de H₂SO₄ 2N e procedeu-se à leitura da densidade óptica a 450 nm. Todas as determinações foram efectuadas em duplicado.

Utilizando os procedimentos gerais praticamente conforme descrito antes, preparou-se os seguinte peptidos específicos: BCH-152, BCH-219, BCH-221, BCH-228, BCH-234, BCH-296, BCH-298, BCH-404, BCH-407, BCH-411, BCH-142, BCH-416, BCH-418, BCH-447, BCH-456 e BCH-486. Depois procedeu-se à avaliação da capacidade desses peptidos para detectarem os anticorpos específicos dos VLTH-I e VLTH-II.

Experiência 1

Na Experiência 1 efectuou-se a comparação dos peptidos individuais BCH-152, BCH-228, de uma mistura formada por quantidades iguais dos peptidos BCH-152 e BCH-228 e de um peptido individual BCH-234 em ensaios segundo o protocolo ELISA utilizando um painel de amostras de soro e de plasma seropositivas e seronegativas. O peptido BCH-234 é um peptido tandem em que o peptido BCH-152 (com um resíduo Pro no terminal N) está acoplado ao peptido BCH-228. Os resultados representam as relações entre o sinal e o valor de transição e estão indicados no quadro 1.

QUADRO 1

SORO Nº	W.B.	IEE COM O PEPTIDO DE SÍNTESE			
		152	228	152 + 228	234
BBI-168	NEG	0,50	0,58	0,50	0,44
SCI*1/250	POS	8,71	5,94	—	13,5
B-12	POS	1,60	2,12	1,80	3,78
B-14	POS	0,85	6,37	2,10	11,5
B-18	POS	0,50	1,75	0,95	3,72
B-20	POS	0,45	6,33	1,55	11,7
B-21	POS	0,40	2,58	1,00	9,67
B-22	POS	0,50	1,58	0,55	9,89
B-23	POS	2,75	3,42	2,70	9,67
B-27	POS	2,11	2,79	2,45	7,17
B-30	POS	10,4	2,04	9,85	10,7
B-31	POS	1,55	5,08	2,10	12,8
A02-1	POS	0,39	0,45		0,30
A02-2	POS	> 14	13,7		> 14
A02-3	POS	0,34	0,34		0,21
A02-4	POS	0,75	0,76		0,40
A02-5	POS	0,32	0,39		0,28
A02-6	IND**	0,38	0,36		0,23
A02-7	POS	0,89	0,79		2,72
A02-8	POS	0,52	0,63		0,43
A02-9	POS	0,78	0,66		0,47
A02-10	POS	8,71	4,73		10,5

** Indeterminável

No Quadro 1 as amostras marcadas com B- foram obtidas no Japão e as marcadas com BBI-168, SC1* 1/250 e A02- foram obtidas nos Estados Unidos da América do Norte. Conforme referido antes, as amostras americanas são inferiores aos valores medidos nas amostras de sangue provenientes do Japão.

Nesta experiência, o valor de transição indicado antes para o qual uma amostra é considerada positiva relativamente à presença de anticorpos contra os VLTH-I e VLTH-II foi definido como sendo o valor da densidade óptica (D.O.) obtido com a amostra de controlo negativa (BBI-168) mais 0,10. Os resultados apresentados correspondem às relações entre o sinal e o valor de transição. As amostras de soro que permitem determinar uma relação igual ou superior a 1,0 são consideradas positivas.

O peptido BCH-152 reconheceu 8 dessas 21 amostras seropositivas em VLTH-I/VLTH-II. O peptido BCH-228 detectou 14 em 21 amostras. Embora o peptido BCH-228 seja capaz de detectar todas as amostras obtidas no Japão (ainda que com titulações relativamente fracas), detectou apenas 2 em 10 amostras americanas. Em consequência, a origem dos soros origina uma diferença nítida de sensibilidade utilizando esses peptidos individuais.

Uma vez que os peptidos BCH-152 e BCH-228 representam epítopes distintos do VLTH-I, efectuou-se a sua mistura numa tentativa para aumentar a sensibilidade de detecção. Conforme se indica no Quadro 1, o sinal medido com a mistura foi em todos os casos inferior ao sinal medido com o melhor dos dois peptidos tomado isoladamente. Desta forma

conclui-se que não se observou qualquer efeito aditivo quando esses dois peptídeos foram misturados conjuntamente.

Surpreendentemente, um peptídeo em tandem constituído por esses dois peptídeos, por exemplo, o peptídeo BCH-234, aumentou notavelmente a sensibilidade de detecção dos anticorpos contra os VLTH-I/II. Em todos os casos a relação entre sinal/valor de transição registada foi superior com o peptídeo em tandem BCH-234 do que com os peptídeos individuais ou com a sua mistura. O peptídeo BCH-234 detectou 15 em 21 amostras testadas. Por outro lado, para além de ser capaz de detectar uma outra amostra no painel americano (A02-7), as relações sinal/valor de transição medidas no painel japonês (série B-) com o peptídeo BCH-234 foram em todos os casos superiores às relações obtidas com os peptídeos individuais.

Experiência 2

Na Experiência 2 os peptídeos BCH-219, BCH-221, BCH-296 e BCH-298 foram testados de acordo com o protocolo ELISA utilizando um painel de amostras de soro e de plasma seropositivas e seronegativas obtidas em "Boston Biomedica Inc." (todas elas estirpes norte-americanas).

Os resultados representam relações entre o sinal e o valor de transição e encontram-se indicados no Quadro 2.

QUADRO 2

SORO	W.B.	IEE COM O PEPTIDO DE SÍNTESE			
		219	221	298	296
BBI-168	NEG	0,20	0,33	0,50	0,21
SCI*1/250	POS	0,30	0,39	12,74	9,50
A02-1	POS	11,8	0,41	4,50	3,71
A02-2	POS	0,55	0,71	>14	>14
A02-3	POS	1,20	0,38	0,85	0,38
A02-4	POS	0,55	0,61	2,30	0,62
A02-5	POS	1,15	0,53	2,85	1,67
A02-6	IND	0,40	0,35	0,60	0,42
A02-7	POS	0,35	0,48	9,45	7,71
A02-8	POS	4,15	0,52	1,65	1,00
A02-9	POS	11,5	0,51	1,25	0,75
A02-10	POS	0,55	0,55	12,6	8,92
A02-11	IND	4,40	0,57	4,35	2,75
A02-12	POS	1,15	0,44	2,85	1,83
A02-13	IND	0,80	0,43	1,45	1,04
A02-14	POS	9,75	0,44	12,1	8,71
A02-15	POS	3,30	0,37	6,00	2,71
A02-16	POS	1,60	0,41	3,00	2,04
A02-17	IND	0,80	0,39	1,20	2,75
A02-18	POS	3,20	3,68	11,1	1,46
A02-19	POS	10,0	0,41	0,85	2,21
A02-20	POS	0,45	0,34	>14	>14
A02-21	POS	4,85	0,38	3,05	2,71
A02-22	POS	4,60	0,36	4,00	2,25
A02-23	IND	5,15	0,54	3,95	2,33
A02-24	POS	>14	0,35	13,6	3,12
A02-25	POS	2,55	0,49	1,75	1,21

O peptido BCH-219 detectou 17 em 26 amostras seropositivas testadas. O que é mais importante é que o peptido BCH-219 foi capaz de detectar a presença de anticorpos contra os VLTH em amostras que não haviam sido detectadas com o peptido BCH-234 (veja-se o Quadro 1). O peptido BCH-298 (a-TTDSNNSIILPPFSLAPVPPPATRRRR-b; env(281-308) VLTH-II), o qual é uma versão mais comprida do peptido BCH-221 e o qual possui um resíduo serina na posição 285 em vez do resíduo cisteína natural (isto foi feito para evitar a dimerização do peptido, para aumentar a sua estabilidade e para aumentar a especificidade do teste) detectou 23 em 26 amostras. Este último resultado ilustra a importância dos resíduos env(281-292) os quais não existem no peptido de características mais insuficientes BCH-221 (a-PFSLAPVPPPATRRRR-b; env(293-308) VLTH-II) e os quais contribuem bastante para a antigenicidade acrescida do peptido BCH-298. O peptido BCH-296 (a-AIVSSPSHNSLILPPFSLSPVPTLGSRSRR-b; env(283-312) VLTH-II) detectou 22 em 26 amostras mas os sinais foram geralmente inferiores aos que é possível obter quando se utiliza o peptido BCH-298. Contudo descobriu-se finalmente que quando se utilizou os peptidos BCH-298 ou BCH-296 sob a forma de uma mistura, eles foram responsáveis pela detecção de um grande número de falsos positivos. Por exemplo, a despistagem de 500 amostras a partir de doadores de sangue normal conduziu a 38 detecções seropositivas putativas quando o peptido BCH-298 fez parte da mistura de três peptidos. Foram sintetizados diferentes análogos dos peptidos com o objectivo de se identificar e eliminar as regiões dos peptidos BCH-298 e BCH-296 que foram responsáveis por essas respostas não específicas. Os peptidos BCH-404, BCH-407, BCH-416 e BCH-418 foram particularmente úteis para se alcançar este objectivo (veja-se o Quadro 3).

Experiência 3

Na experiência 3 foram utilizadas as soluções preparadas com cada um dos seguinte peptidos: BCH-404, BCH-407, BCH-416 e BCH-418, na concentração de 10µg/ml, para revestir as placas do IEE conforme descrito antes. Preparou-se também uma mistura dos peptidos misturando volumes iguais de 3 das soluções dos peptidos descritas antes (BCH-219, BCH-234 e BCH-416) e utilizou-se para revestir outra série de placas. Todas as amostras seropositivas foram obtidas em "Boston Biomedica Inc.".

Os resultados representam as relações entre o sinal e o valor de transição e encontram-se representados no Quadro 3. Nesta experiência o valor de transição (0,20) é o valor médio da D.O. medido em 50 amostras obtidas a partir de uma população doadora de sangue normal, adicionando-se-lhe 4 vezes o desvio padrão (valor de transição = $X_{NEG} + 4 D.P.$)

QUADRO 3

SORO	IEE COM O PEPTIDO DE SÍNTESE				
					219+
Nº	404	407	416	418	234+416
A02-1	0,74	0,81	7,17	9,21	>23,33
A02-2	>10,37	>23,33	>23,33	>23,33	>23,33
A02-3	0,63	0,31	0,38	0,38	1,20
A02-4	0,87	1,13	6,25	0,99	6,31
A02-5	0,81	1,34	2,42	5,26	7,46
A02-6	0,66	0,23	0,24	0,16	0,66
A02-7	7,20	18,78	18,33	22,92	>23,33
A02-8	0,67	0,63	2,53	2,45	7,42
A02-9	0,96	1,58	7,93	1,72	>23,33
A02-10	1,15	7,17	22,33	>23,33	>23,33
A02-11	0,68	1,39	7,80	7,78	16,77
A02-12	0,77	1,53	2,74	6,00	7,87
A02-13	0,63	0,49	2,02	2,37	5,77
A02-14	5,78	15,67	22,28	>23,33	>23,33
A02-15	2,33	11,32	4,76	9,52	16,43
A02-16	0,71	0,43	5,38	6,17	13,39
A02-17	0,67	0,46	1,51	1,79	2,17
A02-18	0,69	0,52	2,95	>23,33	8,06
A02-19	0,65	0,37	0,80	0,66	7,17
A02-20	1,10	10,03	>23,33	>23,33	>23,33
A02-21	0,90	1,59	3,73	4,95	9,14
A02-22	0,91	1,48	5,86	7,13	22,23
A02-23	1,10	1,98	5,93	6,97	18,39
A02-24	4,13	22 01	13,82	>23,33	>23,33
A02-25	0,83	0,98	2,17	2,56	5,87

Efectuou-se a sintetização dos peptídeos BCH-404, BCH-407 e BCH-418 com o objectivo de se descobrir um que fosse capaz de manter os mesmos níveis de sensibilidade do peptídeo BCH-298 (a-TT DNSNNSIILPPFSLAPVPPPATRRRR-b; env(281-308) VLTH-II)) mas que não conduzisse a sinais falsos positivos. O peptídeo BCH-418 é tão útil como o peptídeo BCH-298 para a detecção de amostras seropositivas e não origina sinais falsos positivos quando testado em 500 amostras de soro obtidas a partir de doadores de sangue normal. Deste modo o peptídeo BCH-418 (o qual é idêntico ao peptídeo BCH-298 com a excepção de não existirem os últimos três resíduos arginina) é tão sensível como o peptídeo BCH-298 para a detecção de anticorpos contra os VLTH-I e VLTH-II e é também mais específico. Efectuou-se uma observação semelhante com o peptídeo de síntese BCH-416 do VLTH-I o qual constitui uma versão mais curta do peptídeo BCH-296 do VLTH-I. Como consequência concluiu-se que esses três resíduos aminoácidos localizados próximo da extremidade do terminal C da proteína gp46 tanto do VLTH-I como do VLTH-II contribuem para a ligação de moléculas anticorpo não relacionadas com a infecção dos VLTH-I e VLTH-II.

Efectuou-se também o teste de uma mistura de peptídeos contendo um peptídeo preferencial em tandem BCH-234 do VLTH-I e peptídeos derivados da sequência dos VLTH-II (BCH-219 e BCH-416). Os resultados apresentados no Quadro 3 demonstram que esta mistura pode surpreendentemente detectar todas as amostras seropositivas em VLTH-I e VLTH-II confirmadas que foram testadas. A amostra A02-6, a qual havia sido considerada indeterminada pelo método da mancha de western e por imunofluorescência (IFA) originou um resultado negativo de acordo com este teste. A amostra foi considerada fracamente positiva em um teste em dois.

Experiência 4

Na Experiência 4 foram utilizadas soluções preparadas com os peptídeos de síntese BCH-411 e BCH-412 na concentração de 10 µg/ml para efectuar o revestimento de placas de IEE conforme descrito antes. As amostras testadas foram obtidas no Japão.

Os resultados representam as relações entre o sinal e o valor de corte e estão indicados no Quadro 4. O valor de corte nesta experiência é a média dos valores D.O. obtidos com três amostra negativas, adicionando-se 4 vezes o valor D.P.

QUADRO 4

SORO Nº	IEE COM O PEPTIDO DE SÍNTESE	
	411	412
B-12	1,74	1,34
B-13	3,55	1,21
B-14	9,84	2,42
B-15	6,50	1,97
B-16	2,64	2,24
B-17	14,43	2,26
B-18	1,81	1,39
B-19	2,01	1,95
B-20	7,17	1,47
B-21	2,70	1,87
B-22	1,78	1,89
B-23	3,51	1,05
B-24	4,61	1,55
B-25	2,74	2,16
B-26	12,09	2,24
B-27	2,38	2,32
B-28	10,56	1,92
B-29	1,90	2,26
B-30	5,39	2,16
B-31	34,54	3,55

Experiência 5

Na Experiência 5 foram testados os peptidos BCH-219, BCH-447, BCH-456 e BCH-486 de acordo com o protocolo ELISA utilizando um painel de amostras de soro e de plasma

seropositivas e seronegativas obtidas em "Boston Biomedica Inc.".

Os resultados (Quadro 5) representam as relações entre o sinal e o valor de transição. O valor de transição é a média dos valores de absorvência medidos para três amostras de soro negativo, tendo-se-lhe adicionado 0,100.

O peptido BCH-219 detectou 18 em 25 amostras seropositivas testadas (Quadro 5). Duas das amostras (nºs. A02-6 e A02-17) não foram detectadas pelo peptido BCH-219 sendo o resultado indeterminado pelo método das bandas de Western (WB) ou (BW). Nesta experiência verificou-se que a amostra A02-2, a qual foi obtida a partir de um paciente infectado com o VLTH-I, era positiva. Noutras experiências esta amostra não proporcionou uma detecção de carácter positivo com o peptido BCH-219. De modo idêntico a amostra A02-16, a qual não foi detectada como sendo positiva nesta experiência, pôde ser detectada noutros testes com o peptido BCH-219.

O peptido BCH-447 detectou todas as amostras de VLTH-I e VLTH-II testadas. O peptido BCH-456 não detectou qualquer das quatro amostras de VLTH-I e conduziu também a um resultado negativo com a amostra (A02-6) que havia originado um resultado indeterminado pelo método da mancha de Western (WB). O perfil ou a reactividade do peptido BCH-486 é semelhante à do peptido BCH-456. Embora os sinais medidos com o peptido BCH-486 sejam geralmente superiores aos que são obtidos com o peptido BCH-456, é preferível este último uma vez que o peptido BCH-486 origina um sinal negativo na periferia (0,94) com uma amostra de VLTH-II (A02-4).

QUADRO 5

SORO		IEE COM O PETIDO DE SÍNTESE			
		219	447	456	486
Nº	W.B.				
A02-1	VLTH-II	14,99	18,75	9,09	16,67
A02-2	VLTH-I	1,91	1,81	0,60	0,50
A02-3	VLTH-II	1,62	4,38	1,91	3,50
A02-4	VLTH-II	0,73	1,50	1,30	0,94
A02-5	VLTH-II	1,19	8,25	8,45	5,00
A02-6	Ind.	0,51	1,19	0,15	0,33
A02-7	VLTH-I	0,57	1,31	0,30	0,50
A02-8	VLTH-II	3,91	10,75	5,09	11,17
A02-9	VLTH-II	17,65	16,75	8,12	15,39
A02-10	VLTH-I	0,52	1,44	0,39	0,56
A02-11	VLTH-II	4,42	9,63	4,91	9,28
A02-12	VLTH-II	1,72	9,06	7,88	4,72
A02-13	Ind.	1,11	2,56	5,55	1,72
A02-14	VLTH-II	10,74	15,25	8,30	16,67
A02-15	VLTH-II	3,65	6,50	3,52	6,61
A02-16	VLTH-II	0,58	12,50	6,12	12,17
A02-17	Ind.	0,86	2,06	1,36	1,50
A02-18	VLTH-II	2,95	6,81	3,15	5,61
A02-19	VLTH-II	12,83	14,38	9,09	16,67
A02-20	VLTH-I	0,64	1,25	0,12	0,22
A02-21	VLTH-II	3,68	11,31	6,18	10,50
A02-22	VLTH-II	6,45	9,69	5,33	10,78
A02-23	VLTH-II	6,20	10,44	5,48	11,33
A02-24	VLTH-II	17 65	18,75	9,09	16,67
A02-25	VLTH-II	2,62	6,31	4,94	6,39

Experiência 6

Na Experiência 6 efectuou-se a preparação de três misturas de peptidos (10 µg de peptido total / ml de solução) as quais foram utilizadas para revestir placas do IEE conforme descrito antes. A composição de cada mistura de peptidos e os resultados obtidos encontram-se descritos nos Quadro 6. Todas as amostras testadas foram obtidas em "Boston Biomedica Inc." e os resultados são expressos em termos de relação entre o sinal e o valor de transição, conforme explicado antes.

A primeira mistura contendo o peptido BCH-219 não detectou as amostras A02-4 e A02-6; a amostra A02-3 foi considerada negativa na zona limítrofe. Embora a amostra A02-6 tivesse conduzido a um resultado indeterminado pelo método WB, as amostras A02-3 e A02-4 foram confirmadas como sendo positivas em VLTH-II e não devia ter havido falhas. A terceira mistura contendo o peptido BCH-447 falhou também a detecção das amostras 4 e 6 mas foi capaz de reconhecer a amostra A02-3 como sendo positiva. Os sinais registados com a mistura contendo o peptido BCH-447 foram superiores aos resultados medidos quando se utilizou a mistura contendo o peptido BCH-219. Finalmente a mistura contendo o peptido BCH-456 detectou todas as amostras como sendo positivas em VLTH-I ou VLTH-II e na maioria dos casos as relações proporcionais foram superiores às obtidas com as outras duas misturas. Esta experiência demonstrou que uma mistura contendo os peptidos BCH-234, BCH-456 e BCH-416 proporciona a melhor sensibilidade para detectar simultaneamente as amostras seropositivas em VLTH-I e VLTH-II.

Nesta experiência foram também testadas 36 amostras (n^ºs. 301 a 336) obtidas a partir de uma população de

dadadores de sangue normal. Foram todas consideradas negativas mas a amostra 310 originou um sinal fortemente positivo ao ser medida em presença da mistura de peptidos que continha o peptido BCH-219. Esta amostra foi posteriormente confirmada como sendo negativa pelo método WB. Finalmente, outra amostra identificada por E8-2109-272 também foi considerada positiva com a mistura dos peptidos BCH-234:BCH-219:BCH-416 embora fosse considerada negativa pelo método WB. Esta amostra não originou um sinal falso em presença das outras duas misturas de peptidos demonstrando consequentemente os seus superiores graus de especificidade.

A Experiência 6 demonstrou a superioridade do peptido BCH-447 e mais preferencialmente do peptido BCH-456 em relação ao peptido BCH-219 devido ao facto de aumentar tanto a sensibilidade como a especificidade de uma mistura de peptidos concebida com o objectivo de detectar os anticorpos específicos dos VLTH-I e VLTH-II.

QUADRO 6

IEE COM O PEPTIDO DE SÍNTESE			
SORO			
Nº	234:219:416	234:447:416	234:456:416
A02-1	6,99	13,95	12,94
A02-2	13,95	13,95	15,00
A02-3	0,96	1,35	1,33
A02-4	0,68	0,87	1,44
A02-5	1,40	2,24	8,45
A02-6	0,30	0,54	0,60
A02-7	6,92	11,07	12,61
A02-8	2,75	5,71	6,06
A02-9	13,95	13,95	12,02
A02-10	13,95	13,95	15,00
A02-11	3,73	5,51	6,65
A02-12	1,79	2,88	9,15
A02-13	1,17	2,08	2,78
A02-14	10,71	13,95	15,00
A02-15	3,87	5,75	7,09
A02-16	2,80	6,33	5,77
A02-17	1,13	1,69	1,54
A02-18	2,03	2,65	3,70
A02-19	5,46	13,95	13,46
A02-20	13,95	13,95	15,00
A02-21	2,23	3,70	5,72
A02-22	5,56	7,49	8,75
A02-23	4,61	7,90	9,20
A02-24	13,95	13,95	15,00
A02-25	1,91	3,19	3,32
301	0,29	0,39	0,51
302	0,49	0,56	0,36
303	0,49	0,48	0,50
304	0,39	0,41	0,39
305	0,51	0,38	0,52
306	0,33	0,53	0,53

QUADRO 6 (continuação)

SORO	IEE COM O PEPTIDO DE SÍNTESE		
Nº	234:219:416	234:447:416	234:456:416
307	0,38	0,56	0,50
308	0,33	0,7	0,44
309	0,37	0,62	0,50
310	4,29	0,73	0,48
311	0,42	0,46	0,57
312	0,48	0,42	0,43
313	0,33	0,48	0,48
314	0,56	0,59	0,36
315	0,33	0,76	0,52
316	0,58	0,60	0,55
317	0,28	0,54	0,40
318	0,47	0,61	0,36
319	0,62	0,56	0,52
320	0,49	0,51	0,42
321	0,41	0,57	0,54
322	0,33	0,52	0,53
323	0,32	0,71	0,30
324	0,59	0,53	0,56
325	0,46	0,56	0,34
326	0,30	0,44	0,51
327	0,36	0,43	0,52
328	0,29	0,40	0,52
329	0,33	0,51	0,54
330	0,39	0,55	0,54
331	0,41	0,56	0,24
332	0,50	0,60	0,31
333	0,57	0,67	0,40
334	0,40	0,53	0,43
335	0,59	0,47	0,44
336	0,52	0,59	0,33
E8-2109-272	2,68	0,77	0,51

Experiência 7

Na Experiência 7 submeteu-se 25 amostras de soro obtidas a partir de pacientes identificados pelo método da reacção em cadeia da polimerase (RCP) como sendo portadores de VLTH-I (série HT-100) ou de VLTH-II (série HT-200) a análise sobre placas revestidas com o peptido BCH-234 (específico do VLTH-I) ou com os peptidos BCH-219 ou BCH-456 (específicos do VLTH-II). Os resultados apresentados no Quadro 7 são as relações entre o sinal e o valor de transição, calculadas conforme especificado antes.

O Quadro 7 ilustra a facilidade com que os peptidos BCH-234 e BCH-456 podem distinguir selectivamente as amostras obtidas a partir de um paciente infectado com o VLTH-I relativamente a um paciente infectado com o VLTH-II. As amostras de 5 pacientes infectados com o VLTH-I originaram um sinal forte ao serem testadas com o peptido específico do VLTH-I (BCH-234) e apenas um fraco sinal em presença do peptido BCH-219. É de salientar que essas 5 amostras foram todas consideradas negativas quando foram testadas em presença do peptido BCH-456 específico do VLTH-II. Além disso, as 20 amostras provenientes de pacientes infectados com VLTH-II foram todas facilmente detectadas com o peptido BCH-456 ficando consequentemente demonstrada a sua excelente capacidade para discriminar selectivamente amostras provenientes de pacientes infectados com o VLTH-II relativamente às amostras obtidas em pacientes infectados com o VLTH-I.

QUADRO 7

ANALISE POR RCP		IEE COM O PEPTIDO DE SÍNTESE		
SORO		BCH-234	BCH-219	BCH-456
Nº		(VLTH-I)	(VLTH-II)	(VLTH-II)
HT-101	VLTH-I	11,11	0,62	0,85
HT-102	VLTH-I	11,11	1,07	0,97
HT-103	VLTH-I	11,11	1,92	0,79
HT-104	VLTH-I	11,11	1,12	0,61
HT-105	VLTH-I	8,72	1,32	0,75
HT-201	VLTH-II	1,03	5,52	25,00
HT-202	VLTH-II	1,68	1,86	16,63
HT-203	VLTH-II	0,81	2,25	10,44
HT-204	VLTH-II	0,75	3,34	15,07
HT-205	VLTH-II	1,07	9,09	25,00
HT-206	VLTH-II	1,43	9,09	25,00
HT-207	VLTH-II	1,82	1,94	14,37
HT-208	VLTH-II	1,75	5,82	21,03
HT-209	VLTH-II	0,91	4,05	25,00
HT-210	VLTH-II	0,90	1,58	6,38
HT-211	VLTH-II	0,76	9,09	25,00
HT-212	VLTH-II	0,67	6,87	22,54
HT-213	VLTH-II	1,17	2,42	8,53
HT-214	VLTH-II	1,48	6,87	25,00
HT-215	VLTH-II	1,85	9,09	25,00
HT-216	VLTH-II	1,09	2,98	17,37
HT-217	VLTH-II	1,15	1,43	9,57
HT-218	VLTH-II	1,16	0,67	1,75
HT-219	VLTH-II	0,66	0,61	3,78
HT-220	VLTH-II	0,99	5,79	16,75

Embora se tenham descrito diversos aspectos da presente invenção, é evidente que as construções básicas indicadas podem ser alteradas de modo a proporcionar outras variantes nas quais se utilize os processos e composições da presente invenção. Em consequência faz-se observar que o âmbito da presente invenção é definido pelas reivindicações anexas em vez dos aspectos específicos que foram apresentados a título de exemplo.

Figura 1

PROTEINAS DA MEMBRANA ENVOLVENTE

VLTH-I 1 MGKFLATLILFFQFCPLIFGDYSPSCCTLTIGVSSYHSKPCNPAQPVCSW
VLTH-II 1 MGNVF..FLLLSLTHFPLAQ..QSRCTLTIGISSYHSSPCSPTQPVCTW

51 TLDLLALSADQALQPPCPNLVSYSSYHATYSLYLFPHWTKKPNRNGGGYY
47 NLDLNSLTDDQRLHPPCPNLITYSGFHKTYSLYLFPHWIKKPNRQGLGY

101 SASYSDFCSILKCPYLGCSWTCPYTGAUSSPYWKFQHDVNFTQEVSRINI
97 SPSYNDPCSILQCPYLGCSQAWTSAYTGPVSSPSWKFHSDVNFTQEVSVSL

151 NLHFSKCGFFSLLVDAPGYDPIWFLNTEPSQLPPTAPPLLPHSNLDHIL
147 RLHFSKCGSSMTLLVDAPGYDPLWFITSEPTQPPPTSPPLVHDSLEHVL

201 EPSIPWKSLLTLVQLTLQSTNYTCIVCIDRASLSTWHVLYSPNVSV.P.S
197 TPSTSWTKILKFIQLTLQSTNYSVMVCVDRSSLSSWHVLYTPNISIPQQ

250 SSSTPLLYPSLALPAPHLTLFPNWHCFDPQIQAIIVSSPCHNSLILPPFS
247 TSSRTILFPSLALPAPP.SQFPFWTHCYQPRQAITDNCNNSIILPPFS

gp46 <> gp21
300 LSPVPTLGSRSRRAVPVAVWLVSALAMGAGVAGGITGSMSLASGKSLIHE
296 LAPVPPPATRRRRRAVPVAVWLVSALAAGTGIAGGVGTGSLSLASSKSLLE
gp46 <> gp21

350 VDKDISQLTQAIVKNHKNLKIQAQYAAQNRRLDILLFWEQGGLCKALQEQ
346 VDKDISHLTQAIVKNHQNIIRVAQYAAQNRRLDILLFWEQGGLCKAIQEQ

400 CRFPNITNSHVPILQERPPLENRVLTGWGLNWDGLSQUAREALQTGITL
396 CCFNINISNTHVSVLQERPPLEKRVITGWGLNWDGLSQUAREALQTGITI

450 VALLLLVLGAPCILRQLRHLPSRV..RYPHYSLIKPESSL
446 LALLLLVILFGPCILRQIQALPQLQNRHNQYSLINPETML

Figura 2

PROTEINAS GAG

VLTH-I 1 MGQIFSRASPIPRPPRGLAAHHLNFIQAAYRLEPGSSYDFHQLKKFL
VLTH-II 1 MGQIHGLSPTPIPKAPRGLSTHHLNFIQAAYRLQPRPSDFDFQLRRFL

51 KIALETPARICPINYSLLASLLPKGYPCRVNEILHILIQTAQIPSRPA?
51 KLALKTPILWLNPIDYSLIASLIPKGYPCRVVEIINILVKNQVSPSAPAAP

p19 <> p24
101PPPSSPTHDPDSDPQIPPPYVEPTAPQVLPVMHPHGAPPNHRP
101 VPTPICPTTTPPPPPPSPEAHVPPPYVEPTTTQCFPI LHPPGAPSAHRP
p15 <> p24

145 WQMKDLQAIKQEVSSAAGSPQFMQTIRLAVQQFDPTAKDLQDLLQYLCS
151 WQMKDLQAIKQEVSSALGSPQFMQTLRLAVQQFDPTAKDLQDLLQYLCS

195 SLVASLHHQQLDSLISEAETRGITGYNPLAGPLRVQANNPQQQLRREYQ
201 SLVVSLHHQQLNTLITEAETRGMTGYNPMAGPLRMQANNPAQQQLRREYQ

245 QLWLAFAALPGSAKDPSWASILQGLEEYPYHAFVERLNIALDNGLPEGTP
251 NLWLAFASTLPGNTRDPSWAAIILQGLEEYPYCAFVERLNVALDNGLPEGTP

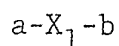
295 KDPIRLSLAYSANKECQKLLQARGHTNSPLGDMRLACQTWTPKDGTKVL
301 KEPILRLSLAYSANKECQKILQARGHTNSPLGEMLRTCQAWTPKDGTKVL

> p15
345 VVQPKKPPPNQPCFRCGKAGHWSRDCTQPRPPPGPCPLCQDP THWKRDGP
351 VVQPRRPPPTQPCFRCGKVGHWSRDCTQPRPPPGPCPLCQDP SHWKRDGP
> p12

395 RLKPTIPEPEPEEDALLDLP..ADIPHPKNSIGGEV
401 QLKP...PQEEGEPLLDLPSTSGTTEEKNSLRGEI

NOVAS REIVINDICAÇÕES

1.- Processo para a preparação de péptidos de fórmula geral



na qual

X_1 representa uma sequência de pelo menos seis aminoácidos retirados como um bloco dos aminoácidos AA₂₈₃-AA₃₀₉ da proteína gp46 env (HTLV-I) ou os seus análogos;

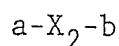
a representa um terminal amino, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos; e b representa um terminal carboxi, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;

caracterizado pelo facto de compreender a preparação dos péptidos mediante recurso a métodos sintéticos ou recombinantes.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

terizado pelo facto de X_1 representar
-AIVSSPSHNSLILPPFSLPVPTLGSR- (BCH-416) e os seus análogos.

3.- Processo para a preparação de péptidos de fórmula geral



na qual

X_2 representa uma sequência com pelo menos seis aminoácidos retirados como um bloco dos aminoácidos AA_{273} - AA_{305} da proteína gp46 env (HTLV-II) ou os seus análogos;

a representa um terminal amino, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos; e b representa um terminal carboxi, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;

caracterizado pelo facto de compreender a preparação dos péptidos mediante recurso a métodos sintéticos ou recombinantes.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de X_2 representar, um membro escolhido no

grupo constituído por:

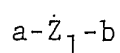
-TTDNSNNSIILPPFSLAPV- (BCH-404)

-YQPRQLQAITTDNSNNSIILPPFSLAPV- (BCH-407)

-TTDNSNNSIILPPFSLAPVPPPATR- (BCH-418)

e os seus análogos.

5.- Processo para a preparação de péptidos de fórmula geral



na qual

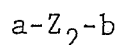
Z_1 representa uma sequência com pelo menos seis aminoácidos retirados como um bloco de AA_{236} - AA_{257} , da proteína gag p24 (HTLV-I) ou os seus análogos;

a representa um terminal amino, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos; e b representa um terminal carboxi, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;

caracterizado pelo facto de compreender a preparação dos péptidos mediante recurso a métodos sintéticos ou recombinantes.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de Z_1 representar -QQGLRREYQQLWLAFAALPGS- (BCH-411) e os seus análogos.

7.- Processo para a preparação de péptidos de fórmula geral



na qual

Z_2 representa uma sequência com pelo menos seis aminoácidos retirados como um bloco de $AA_{242}-AA_{263}$, da proteína gag p24 (HTLV-II) ou os seus análogos;

a representa um terminal amino, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos; e

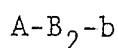
b representa um terminal carboxi, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;

caracterizado pelo facto de compreender a preparação dos péptidos mediante recurso a métodos sintéticos ou recombinantes.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 7, ca-

racterizado pelo facto de Z_2 representar
 -QQGLRREYQNLWLAAAFSTLPGN- (BCH-412) e os seus análogos.

9.- Processo para a preparação de péptidos de fórmula geral



na qual

B_2 representa uma sequência com pelo menos seis aminoácidos retirados como um bloco de $AA_{171}-AA_{207}$ da proteína gp46 env (HTLV-II) ou os seus análogos;

a representa um terminal amino, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos; e

b representa um terminal carboxi, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;

caracterizado pelo facto de compreender a preparação dos péptidos mediante recurso a métodos sintéticos ou recombinantes.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de B_2 representar

-LVHDSLEHVLTPSTSWTKIL- (BCH-219) e os seus análogos.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de B_2 representar um membro escolhido no grupo constituído por:

-FITSEPTQPPPTSPPLVHDSLEHVLTPSTS- (BCH-447)

-TSEPTQPPPTSPPLLVHDSLEHVL- (BCH-456)

-TSEPTQPPPTSPPLVHDSLEHVL- (BCH-486)

e os seus análogos.

12.- Processo para a preparação de péptidos de fórmula geral

$$a-(((J)_n-c)_o - ((U)_p)_q - d)_r)_s - b$$

na qual

J e U, representam, independentemente, cada um, uma sequência com pelo menos seis aminoácidos retirados como um bloco das sequências escolhidas independentemente do grupo constituído por AA₁₉₃-AA₂₁₀ ou AA₂₈₃-AA₃₀₉ da proteína, gp46 env (HTLV-I); AA₂₃₆-AA₂₅₇ da proteína gag p24 (HTLV-I); AA₁₂₀-AA₁₃₀ da proteína gag p19 (HTLV-I); AA₁₇₁-AA₂₀₇ ou AA₂₇₃-AA₃₀₅ da proteína env gp46 (HTLV-II); AA₂₄₂-AA₂₆₃ da proteína gag p24 (HTLV-II); e AA₁₂₆-AA₁₃₆ da proteína gag p19 (HTLV-II) ou os seus aná-

logos;

a representa um terminal amino, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;

b representa um terminal carboxi, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;

c e d, quando presentes, são escolhidos, independentemente de um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou para melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;

n representa um número de 1 a 5;

o representa 1 ou um número de 1 a 5 quando c está presente;

p representa um número de 1 a 5;

q representa um número de 1 a 5;

r representa 1 ou um número de 1 a 5 quando d está presente; e

s representa um número de 1 a 5;

caracterizado pelo facto de compreender a preparação dos péptidos mediante recurso a métodos sintéticos ou recombinantes.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de $((((J)_n)_c)_o - ((U)_p)_q - d)_r)_s$ representar -PHSNLDHILEPSIPWKSKPYVEPTAPQVL- (BCH-234) e os seus análogos.

14.- Processo para a preparação de uma mistura ou associação, caracterizado pelo facto de se promover a solubilização de um ou mais péptidos preparados pelo processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 13 e de se combinarem as soluções de péptidos resultantes.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de se incorporar pelo menos o péptido de fórmula geral

a-AIVSSPSHNSLILPPFSLSPVPTLGSR-b (BCH-416)

na qual

a representa um terminal amino, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos; e
b representa um terminal carboxi, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;

e os seus análogos.

...

16.- Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de se incorporar pelo menos os péptidos de fórmulas gerais:

a-AIVSSPSHNSLILPPFSLSPVPTLGSR-b (BCH-416)

a-PHSNLDHILEPSIPWKSHPYVEPTAPQVL-b (BCH-234)

em que

a representa um terminal amino, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos; e

b representa um terminal carboxi, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;

e os seus análogos.

17.- Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de se incorporar pelo menos os péptidos de fórmulas gerais:

a-AIVSSPSHNSLILPPFSLSPVPTLGSR-b (BCH-416)

a-PHSNLDHILEPSIPWKSHPYVEPTAPQVL-b (BCH-234)

a-TSEPTQPPPTSPPLLVDSDLEHVL-b (BCH-456)

em que

a representa um terminal amino, um a oito aminoácidos, ou um substituinte eficaz para

facilitar a ligação ou melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos; e
b representa um terminal carboxi, um a oito aminoácidos ou um substituinte eficaz para facilitar a ligação ou melhorar a actividade imunogénica ou antigénica dos péptidos;
e os seus análogos.

18.- Processo para a preparação de um meio apropriado para detectar a presença de anticorpos para antigénios HTLV-1 e/ou HTLV-2 em uma amostra analítica, caracterizado pelo facto de se combinar um péptido preparado pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 13 ou uma associação ou mistura preparada pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 14 a 17, com agentes auxiliares de formulação apropriados, encontrando-se o péptido ou a associação ou mistura presentes em solução a 0,01-100 $\mu\text{g/ml}$, ou de se depositar sobre um veículo em fase sólida a 0,1 - 1000 $\mu\text{g/cm}^2$.

19.- Método para detectar a presença de anticorpos para antigénios HTLV-I e/ou HTLV-II em uma amostra analítica, caracterizado pelo facto de se fazer contactar uma fracção da referida amostra analítica com um péptido preparado pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 13 ou

com uma associação ou mistura preparada pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 14 a 17, encontrando-se o péptido ou a associação ou mistura presentes em solução a 0,01 - 100 $\mu\text{g/ml}$ ou sobre um veículo em fase sólida a 0,1 - 1000 $\mu\text{g/cm}^2$.

20.- Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de se escolher no grupo constituído pelos métodos de ensaio ELISA, hemaglutinação, mancha-única ou manchas-múltiplas.

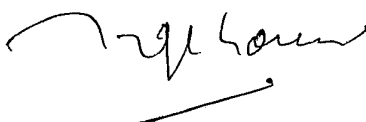
21.- Anticorpo, caracterizado pelo facto de apresentar reacção imunológica cruzada com um péptido ou uma mistura ou associação de péptidos preparados pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 17 ou uma mistura dos referidos anticorpos.

22.- Anticorpo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo facto de ser um anticorpo monoclonal ou uma mistura de anticorpos monoclonais.

23.- Processo para a preparação de um meio apropriado para detectar a presença de antígenos HTLV-I e/ou HTLV-II em uma amostra analítica, caracterizado pelo facto de se combinar um anticorpo tal como descrito na reivindicação 21 ou

22, em que o péptido ou mistura se encontra presente em solução a 0,01 - 100 $\mu\text{g/ml}$ ou sobre um veículo em fase sólida a 0,1 - 1000 $\mu\text{g/cm}^2$.

24.- Método para detectar a presença de antigénios HTLV-I e/ou HTLV-II em uma amostra analítica, caracterizado pelo facto de se fazer contactar uma fracção dessa amostra analítica com um anticorpo tal como descrito na reivindicação 21 ou 22, em que o péptido ou associação ou mistura se encontra presente em solução a 0,01 - 100 $\mu\text{g/ml}$ ou sobre um veículo em fase sólida a 0,1 - 1000 $\mu\text{g/cm}^2$.



98356

FIG. 1A

PROTEÍNAS DA MEMBRANA ENVOLVENTE

UL TH-I 1 MGKFLATLILFFQFCPLIFGDYSPSCCTLTIGVSSYHSPCNPAQPVCSW
UL TH-II 1 MGNVF..FLLLFSLTHEPLAQ..QSRCTLTIGISSYHSSPCSPPTQPVCTW
51 TLDLLALSADQALQPPPCPNLVSYSSYHATYSLYLFPHWTKKPNRNGGGYY
47 NLDLNSLTDDQRLHPPPCPNLITYSGFHKTYSLYLFPHWIKKPNRQGLGYY
101 SASYSDDPCSLKCPYLGCCQSWTCPTYTGAVSSPYWKFQHDVNFTQEVSRINI
97 SPSYNDPCSLQCPYLGCCQAWTSAYTGPVSSPSWKFHSDVNFTQEVQSLSL
151 NLHFSKCGFPFSLLDVAPGYDPIWFLNTEPSQLPPTAPPLLPHSNLDHIL
147 RLHFSKCGSSMTLLVDAPGYDPLWFITSEPTQPPPTSPPLVHDSDLHVL

FIG. 2A

PROTEÍNAS GAS

UL TH-I 1 MCQIFSRASPIPRPRGLAAHHWLNFLQAAVRLPCGPSSYDFHQKKFL
UL TH-II 1 MCQIHGLSPTPIPKAPRGLSTHHWLNFLQAAVRLQPRPSDEFQQLRRFL

51 KIALETPARICPINYSLLASLLPKGYGRVNEIHLIQTQAQIPSRPA?
51 KLALKTPIWLNPIIDYSLLASLIPKGYGRVVEIINILVKNQVSPSAPAAP

101 PPPSSPTHDPDSDPQIPPPYVEPTAPQVLPVMHPHGAPPNHRP p19 <> p24
101 VPTPICPTTTTPPPPPSPEAHVPPPYVEPTTTCFPILHPPGAPSAHRP p15 <> p24

145 WQMKDLQAIKQEVSQAAPGSPQFMQTI RLAVQQFDPTAKDLQDILLQYLCS
151 WQMKDLQAIKQEVSSSALGSPQFMQTI RLAVQQFDPTAKDLQDILLQYLCS

FIG. 1B

201 EPSIPWKSLLTLVQLTLQSTNYTCIVCIDRASLSTWHVLYSPNVSP.S
197 TPSTSWTKILKFIQLTLQSTNYSCHVCVDRSSLSSWHVLYTPNISIPQQ

250 SSSTPLLYPSLALPAPHLTLFFNTHCFDPQIQAI VSSPCHNSLILPPFS
247 TSSRTILFPSSLALPAPP.SQFPFWTHCYQPRIQAITTDNCNNSIILPPFS

gp46 <> gp21

300 LSPVPTLGSRRRAVPVAVWLVSALAMGAGVAGGITGSM SLASGKSLIHE
296 LAPVPPPATRRRRRAVPVIAVWLVSALAACTGIAGGV TGSLSLASSKSLLLE

gp46 <> gp21

350 VDKDISQLTQAI VKNHKNLLKIAQYAAQNRRGLDLLFWEQGG LCKALQEQ
346 VDKDISHLTQAI VKNHQNIILRVAQYAAQNRRGLDLLFWEQGG LCKAIEQ

400 CRFPNITNSHVPILQERPPLENRVLTGWGLNWDGLSQWAREALQTGITL
396 CCFLNISNTHSVSVLQERPPLEKRVITGWGLNWDGLSQWAREALQTGITI

450 VALLLVILAGPCILRQLRHLP SRV..RYPHYSLIKPESSL
446 LALLLVILFCPCILRQIQALPQRLQNRHNQYSLINPETML

FIG. 2B

195 SLVASLHHQQQLDSLISEAETRGITGYNPLAGPLRVQANNPQQQLRREYQ
201 SLVVS LHHQQQLNTLITEAETRGMTGYNPMAGPLRMQANNPAQQQLRREYQ

245 QLWLAAFAALPGSAKDPWSAIIQGLEEYPYHAFVERLNIALDNGLPEGTP
251 NLWLAAFASTLPGNTRDPSWAAIIQGLEEYPYCAFERLNVALDNGLPEGTP

295 KDPILRSLAYSNANKECQKLIQARGHTNSPLGDMLRACQTWTPKDKTKVL
301 KEPILRSLAYSNANKECQKIIQARGHTNSPLGEMLRITCQAWTPKDKTKVL

> p15

345 VVQPKKPPPNQPCFRCKAGHWSRDCTQPRPPGPGCPLOQDPTHWKRDGP
351 VVQPRRPPPTQPCFRCKGVGHSRDCTQPRPPGPGCPLOQDPSSHWRDGP

> p12

395 RLKPTIPEPEPEEDALLDLP..ADIPHPKNSIGGEV
401 QLKP...PQEEGEPLLLDLPSTSGTTEKNSLRGEI