(19) **RU** (11) **2 203 679** (13) **C2**

(51) МПК[7] **A 61 K 38/08, 39/395, G 01 N 33/53**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: **98106385/14 , 02.07.1997**

(24) Дата начала действия патента: **02.07.1997**

(30) Приоритет: **10.07.1996 IT RM96A000496**

(43) Дата публикации заявки: **27.03.2000**

(46) Дата публикации: **10.05.2003**

(56) Ссылки: **TARRO G. Oncology, 1983, 40, 248-253. RU 94038045 A1, 27.11.1995. RU 2009500 C1, 15.03.1994. US 4270924 A, 02.06.1981.**

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: **10.04.1998**

(86) Заявка PCT:
IT 97/00158 (02.07.1997)

(87) Публикация PCT:
WO 98/01462 (15.01.1998)

(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Н.Г. Лебедевой, рег.№ 0112

(71) Заявитель:
ЮНИХАРТ КОРПОРЕЙШЕН (IE)

(72) Изобретатель: **ТАРРО Джиулио (IT)**

(73) Патентообладатель:
ЮНИХАРТ КОРПОРЕЙШЕН (IE)

(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) ПЕПТИДЫ TLP КОМПЛЕКСА МОЧЕПОЛОВОЙ КАРЦИНОМЫ И ИХ АНТИТЕЛА

(57)

Изобретение относится к медицине. Описывается пептид, содержащий специфический TLP эпитоп мочеполовой карциномы, в котором TLP содержит аминокислотную последовательность: GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn. Описываются также реагенты для детекции указанных мочеполовых TLP и фармацевтическая композиция, содержащая указанный пептид. Изобретение позволяет получать пептиды, обладающие антигенной активностью, а также антитела, способные реагировать с ними, предназначенные для использования в диагностикумах и в клиниках. 5 с. и 1 з.п. ф-лы, 1 табл.

RU 2203679 C2

RU 2203679 C2

(19) **RU** (11) **2 203 679** (13) **C2**

(51) Int. Cl.[7] **A 61 K 38/08, 39/395, G 01 N 33/53**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **98106385/14 , 02.07.1997**

(24) Effective date for property rights: **02.07.1997**

(30) Priority: **10.07.1996 IT RM96A000496**

(43) Application published: **27.03.2000**

(46) Date of publication: **10.05.2003**

(85) Commencement of national phase: **10.04.1998**

(86) PCT application:
IT 97/00158 (02.07.1997)

(87) PCT publication:
WO 98/01462 (15.01.1998)

(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. N.G. Lebedevoj, reg.№ 0112

(71) Applicant:
JuNIKhART KORPOREJShEN (IE)

(72) Inventor: **TARRO Dzhiulio (IT)**

(73) Proprietor:
JuNIKhART KORPOREJShEN (IE)

(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) TLP PEPTIDES OF UROGENITAL CARCINOMA COMPLEX AND THEIR ANTIBODIES

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, peptides, medicine, immunology, oncology, pharmacy. SUBSTANCE: invention describes peptide comprising specific epitope TLP of urogenital carcinoma where TLP comprises the following amino acid sequence: Gly-Pro-Pro-Glu-Val-Gln-Asn-Ala-Asn. Invention describes also reagents used for detection of indicated urogenital TLP and pharmaceutical composition containing indicated peptide. Invention allows to prepare peptides eliciting antigenic activity and to antibodies that are able to react with their and designated for using in diagnosticum and in clinics. EFFECT: valuable medicinal properties of peptide. 6 cl, 1 tbl

RU 2203679 C2

RU 2203679 C2

Изобретение относится к пептидам TLP-комплекса /белки, выделяемые опухолью/, выделенного из карциномы мочеполовой системы.

В частности, настоящее изобретение относится к пептидам TLP белковых комплексов из карциномы мочеполовой системы человека, обладающим антигенной активностью, а также к антителам, способным реагировать с ними, предназначенным для использования в диагностикумах и в клиниках.

TLP-комплексы представляют собой белковые комплексы, которые присутствуют в опухолевых клетках человека. Среди TLP белков описан белок с молекулярным весом 214 кДа /Tarro G., Oncology 40, 248-253, 1983/. TLP выделяют из опухолевых тканей в соответствии со способом, описанным в Европейском патенте EP 283443. В заявке на Итальянский патент PM92A000506 идентифицирован TLP белок из легочной карциномы.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что TLP карциномы мочеполовой системы содержит новые пептиды, имеющие последовательности, которые отличаются от известных TLP пептидов. В связи с этим возникает необходимость в идентификации TLP пептидов, выполняющих функции эпитопов, выделенных из мочеполовой карциномы, с целью получения специфических реагентов, выполняющих функции антител.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали пептид, имеющий последовательность, входящую в состав последовательности TLP белка с молекулярным весом 214 кДа из аденокарциномы шейки матки или яичника и из неоплазии почек.

В связи с этим целью настоящего изобретения является пептид, содержащий TLP специфический эпитоп мочеполовой карциномы, в котором указанный TLP характеризуется наличием аминокислотной последовательности SEQ 1Д I:

GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn

В соответствии с предпочтительным воплощением такой пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ 1Д 1.

Другой целью настоящего изобретения являются специальные реагенты, способные распознавать TLP из мочеполовой карциномы, причем, предпочтительно, указанные реагенты содержат TLP антитела. Более предпочтительно, указанные антитела распознают пептидный фрагмент, имеющий последовательность SEQ 1Д 1.

Еще одной целью настоящего изобретения являются диагностические наборы для идентификации TLP в образце, содержащем антитела изобретения в качестве специальных реагентов.

Другой целью настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного агента пептид изобретения.

Далее, настоящее изобретение описано с помощью примеров, имеющих иллюстративный характер и не ограничивающих сферу изобретения.

Пример 1

Получение опухолевого экстракта

Опухолевую биопсию весом 12,55 г от женщины в возрасте 45 лет с карциномой шейки матки оттаивали при комнатной температуре и хирургическим путем удаляли некротические ткани. Полученный в результате гомогенный материал многократно промывали Трис 1 х /10 мМ Трис-HCl, pH 7.2/ и ткань подвергали трем циклам замораживание-оттаивание.

Использованный Трис-промывной раствор собирали и центрифугировали со скоростью 33.000 об./мин в течение 1 ч. Супернатант собирали и замораживали.

Ткань подвергали ультразвуковой обработке, которую проводили трижды в течение 3 мин и затем ультрацентрифугировали со скоростью 33.000 об./мин в течение 120 мин. Супернатант /5,7 мл/ собирали, фильтровали на фильтрах Agrodisc /0.45 мкм/ и ткань суспендировали до соотношения 1 г/мл Трис, после чего ультрацентрифугировали со скоростью 33.000 об./мин в течение 60 мин. Супернатант /0.5 мл/ фильтровали и добавляли к предыдущему.

Таким же способом обрабатывали образцы тестикулярной карциномы /общий выход 1.9 мл/ и почечной неоплазии.

Пример 2

Идентификация пептидов, входящих в состав TLP белка из карциномы мочеполовой системы

TLP-комплекс выделяли из экстрактов карциномы мочеполовой системы в соответствии со способом, описанным в EP 283443. Использовали следующие образцы:

1/ аденокарциному шейки матки;

2/ тестикулярную карциному;

3/ почечную неоплазию.

В результате было получено следующее содержание белков (см. таблицу).

Идентификацию TLP осуществляли путем определения молекулярного веса /214 кДа/ с помощью анализа электрофорезом в денатурирующих условиях /SDS/.

Удаление основной части примесей осуществляли отбором секций геля, соответствующих кажущемуся молекулярному весу 214 кДа, и дополнительной электроэлюцией с использованием устройства для микроэлектроэлюции /AMICON/.

Далее, чистоту TLP подтверждали анализом методом электрофореза в денатурирующих условиях. Затем TLP переносили на PVDF /поливинилдифторидную/ мембрану с высокой активностью по захвату белка и затем осуществляли аминокислотный анализ по методу Эдмана с использованием устройства для автоматического секвенирования белков фирмы Applied Biosystems.

Во всех образцах была обнаружена следующая аминокислотная последовательность:

GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn /SEQ ID N.1/.

Перечень последовательностей

/I/ Общая информация:

/1/ Заявитель:

/A/ Имя: Instituto Farmacoterapico Italiano S.p.A.

/B/ Улица: Via Paolo Frisi 21/23

/C/ Город: Рим

/E/ Страна: Италия

/F/ Почтовый код /ZIP /: 00197

/A/ Имя: Tarro Giulio c/o Instituto

RU 2203679 C2

RU 2203679 C2

Farmacoterapico Italiano S.p.A.
/B/ Улица: Via Paolo Frisi 21/23
/C/ Город: Рим
/E/ Страна: Италия
/F/ Почтовый код /ZIP /: 00197
/II/ Название изобретения: Пептиды TLP комплекса мочеполовой карциномы и их антитела
/III/ Число последовательностей: 1
/IV/ Компьютер-считываемая форма:
/A/ Тип носителя: гибкий диск
/B/ Компьютер: 1BC PC совместимый
/C/ Операционная система: PC-DOS/MS-DOS
/Д/ програмное обеспечение Patentin Release # 1.0, Версия # 1.30/EPQ/
/2/ Информация для SEQ 1Д 1:
/2/ Характеристики последовательности:
/A/ Длина: 9 аминокислот
/B/ Тип: аминокислота
/C/ Нитевидность: одинарная
/Д/ Топология: линейная
/11/ Молекулярный тип: пептид
/XI/ Описание последовательности: SEQ ID 1:

Gly Pro Pro Glu Val Gln Asn Ala Asn
1 5

ч

Формула изобретения:

1. Пептид, содержащий специфический эпитоп TLP карциномы мочеполовой системы, где указанный TLP содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. I.

2. Пептид по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID No. I.

3. Антитело, способное распознавать по меньшей мере один из пептидов - пептид по п. 1 или пептид по п. 2.

4. Диагностический набор для идентификации TLP в образцах опухолевой мочеполовой системы, содержащий в качестве специфического реагента антитело по п. 3.

5. Способ идентификации TLP-комплексов в образцах опухолей мочеполовой системы, отличающийся тем, что включает в себя следующие стадии: иммунопреципитацию указанного образца первой аликвотой иммунной сыворотки против пептида по п. 1 или 2; обнаружение указанных TLP-комплексов в первом иммунопреципитате посредством реакции со второй аликвотой указанной иммунной сыворотки и с использованием средств обнаружения указанной реакции.

6. Фармацевтическая композиция, обладающая антигенной активностью, содержащая в качестве активного начала пептид по п. 1.

RU 2203679 C2

RU 2203679 C2

Образец	Всего, мг	TLP, мг/мл
Аденокарцинома шейки матки	59.5	9.6
Тестикулярная карцинома	7.4	3.9
Почечная неоплазия	7.4*	1.5

* Общая концентрация почечных белков не позволяла осуществить эффективную очистку TLP.

RU 2203679 C2

RU 2203679 C2