



(11) *Número de Publicação:* PT 851872 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6 )  
C07K014/00 A

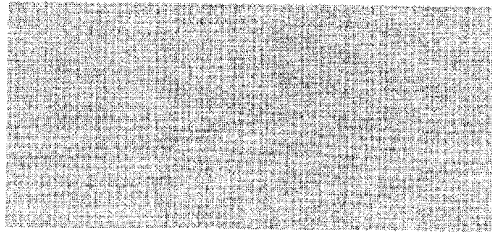
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1997.07.02	(73) <i>Titular(es):</i> UNIHART CORPORATION 41 CENTRAL CHAMBERS, DAME COURT DUBLIN 2 IE
(30) <i>Prioridade:</i> 1996.07.10 IT RM960496	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1998.07.08	(72) <i>Inventor(es):</i> GIULIO TARRO IST. FARMACOTERAPICO ITALIANO S.P.AS IT
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.04.18	(74) <i>Mandatário(s):</i> PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PÉPTIDOS DO COMPLEXO TLP DO CARCINOMA UROGENITAL E ANTICORPOS CONTRA ESTES

(57) *Resumo:*

PÉPTIDOS DO COMPLEXO TLP DO CARCINOMA UROGENITAL E  
ANTICORPOS CONTRA ESTES





## DESCRIÇÃO

### "PÉPTIDOS DO COMPLEXO TLP DO CARCINOMA UROGENITAL E ANTICORPOS CONTRA ESTES"

A presente invenção refere-se a péptidos do complexo TLP (proteínas libertadas com tumores) isoladas do carcinoma do aparelho urogenital.

Em particular a invenção refere-se a um péptido da proteína TLP possuindo uma sequência específica do carcinoma do aparelho urogenital humano apresentada em SEQ ID No. 1 e a anticorpos capazes de reagir com este, a ser utilizados em diagnóstico e clínica.

Os complexos TLP são complexos de proteína que estão presentes em células tumorais humanas. Entre as proteínas TLP está descrita uma proteína de 214 kDa (Tarro G., *Oncology*, **40**: 248-253, 1983). As TLP são isoladas de tecidos tumorais como descrito na patente Europeia EP 283443. O Pedido de Patente Italiana N° RM92A000506 identifica uma proteína TLP de carcinoma de pulmão. O autor da presente invenção verificou surpreendentemente que as TLP de carcinoma do aparelho urogenital compreendem novos péptidos possuindo sequências que diferem de péptidos TLP conhecidos.

Deste modo existe a necessidade de identificar péptidos TLP, actuando como epitopos, do carcinoma urogenital, para produzir reagentes específicos, como anticorpos.

O autor da presente invenção identificou um péptido actuando como um epitopo específico de TLP urogenital que está compreendido na sequência da proteína TLP de 214 kDa da cerviz do útero ou do adenocarcinoma dos testículos, e da neoplasia do rim.

A presente invenção proporciona um péptido actuando como um epitopo específico de TLP de carcinoma urogenital, em que o referido péptido está representado pela sequência de aminoácido como apresentada em SEQ ID No. 1:

GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn



Outro objecto da invenção são reagentes específicos capazes de reconhecerem a TLP do carcinoma urogenital, tais como anticorpos contra TLP. Os anticorpos da invenção são específicos para o fragmento peptídico possuindo a sequência SEQ ID No. 1.

Outro objecto da invenção são "kits" de diagnóstico para identificar TLP de uma amostra compreendendo os anticorpos da invenção como reagentes específicos.

Outro objecto da invenção é uma composição farmacêutica compreendendo como agente activo o péptido da invenção como apresentado na SEQ ID No. 1.

A invenção será agora descrita de acordo com os exemplos exemplificativos mas não limitantes.

#### Exemplo 1 Preparação de extracto tumoral

Uma biópsia tumoral de 12,55 g, de uma mulher de 45 anos de idade possuindo um carcinoma da cerviz, foi descongelado à temperatura ambiente e os tecidos necróticos foram removidos cirurgicamente. Quando o material resultou homogéneo, foram efectuadas muitas lavagens com Tris 1x (Tris-HCl a 10 mM, pH 7,2) e o tecido foi sujeito a três ciclos de congelação/descongelação.

A solução de Tris da lavagem foi recolhida e centrifugada a 33 000 rpm durante 1 h. O sobrenadante foi recolhido e congelado.

O tecido foi sujeito a sonicação três vezes durante três min. e subsequentemente ultracentrifugado a 33 000 rpm durante 120 min. O sobrenadante (5,7 mL) foi colhido, filtrado em filtros Agrodisc (0,45  $\mu$ m), e o tecido foi suspenso para uma razão de 1 g/mL de Tris, e ultracentrifugado a 33 000 rpm durante 60 min. O sobrenadante (0,5 mL) foi filtrado e adicionado ao anterior.

Foi efectuado o mesmo processo em amostras de carcinoma testicular (rendimento total de 1,9 mL) ou neoplasia do rim.

Exemplo 2 Identificação de péptidos compreendidos na proteína TLP de carcinoma urogenital



O complexo TLP é isolado a partir de extractos do carcinoma do aparelho urogenital como descrito na patente EP 283443. As amostras utilizadas são:

- 1) adenocarcinoma da cerviz;
- 2) carcinoma testicular;
- 3) neoplasia do rim.

O conteúdo em proteína mostrou ser o seguinte:

Tabela 1

Amostra	mg Total	mg/mL de TLP
adenocarcinoma da cerviz	59,5	9,6
carcinoma testicular	7,4	3,9
neoplasia do rim	7,4*	1,5

\*A concentração de proteína total do rim não permitiu um rendimento eficiente de purificação de TLP.

A identificação de TLP foi efectuada através da determinação do peso molecular (214 kDa) por meio de análise electroforética desnaturante (SDS).

A remoção da maior parte dos contaminantes foi efectuada por excisão das secções do gel correspondentes a um peso molecular aparente de 214 kDa e por posterior electroeluição com um dispositivo de microelectroeluição (AMICON).

Subsequentemente a pureza de TLP foi confirmada por análise em electroforese desnaturante. A TLP foi então transferida para uma membrana de PVDF (poli-difluoreto de vinilo) com uma actividade de captura de proteína elevada, e foi efectuada uma análise de aminoácidos sequencial de acordo com o método de Edman, com um aparelho de sequenciação automática de proteína de Applied Biosystems.

A sequência de aminoácidos que foi encontrada em todas as amostras foi a seguinte: GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn (SEQ ID No. 1).



LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE:

- (A) NOME: Istituto Farmacoterapico Italiano S.p.A.
- (B) RUA: Via Paolo Frisi 21/23
- (C) CIDADE: Roma
- (E) PAÍS: Itália
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 00197

- (A) NOME: Tarro Giulio c/o Istituto Farmacoterapico Italiano S.p.A.
- (B) RUA: Via Paolo Frisi 21/23
- (C) CIDADE: Roma
- (E) PAÍS: Itália
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 00197

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Péptidos do complexo TLP do carcinoma urogenital e anticorpos contra estes

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 1

(iv) FORMATO DE LEITURA EM COMPUTADOR

- (A) TIPO DE MEIO: Disquete
- (B) COMPUTADOR: IBM PC compatível
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release #1.0, Versão #1.30 (EPO)

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

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

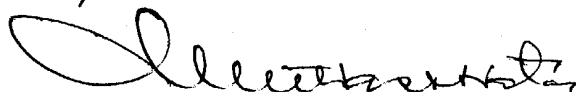
Gly Pro Pro Glu Val Gln Asn Ala Asn

1

5

Lisboa, 10 de Maio de 2001

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



## REIVINDICAÇÕES

1. Péptido actuando como um epitopo específico de TLP urogenital, que está representado por uma sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID No. 1.
2. Anticorpo específico contra o péptido de acordo com a reivindicação 1.
3. "Kit" de diagnóstico para identificar amostras de tumor urogenital compreendendo como reagente específico o anticorpo de acordo com a reivindicação 2.
4. Processo para identificar complexos TLP de amostras de tumor urogenital caracterizado pelos seguintes passos:
  - imunoprecipitação da referida amostra com uma primeira fracção de soro imune contra o péptido de acordo com a reivindicação 1;
  - detecção dos referidos complexos TLP do primeiro imunoprecipitado por meio de uma reacção com uma segunda fracção do referido soro imune e com um meio para detectar a referida reacção.
5. Composição farmacêutica compreendendo como um agente activo o péptido de acordo com a reivindicação 1.

Lisboa, 10 de Maio de 2001

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

