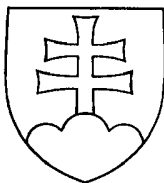


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA  
VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

**470-98**

- (22) Dátum podania: 02.07.97  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: RM96A000496  
(32) Dátum priority: 10.07.96  
(33) Krajina priority: IT  
(40) Dátum zverejnenia: 11.02.99  
(86) Číslo PCT: PCT/IT97/00158, 02.07.97

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> :

**C 07K 14/00**

(71) Prihlasovateľ: INSTITUTO FARMACOTERAPICO ITALIANO S.P.A., Roma, IT;

(72) Pôvodca vynálezu: Tarro Giulio, Roma, IT;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Peptidy komplexu TLP urogenitálneho karcinómu a ich protilátky**

(57) Anotácia:  
Peptid obsahujúci TLP špecifický močovopohlavný epitop, kde TLP obsahuje aminokyselinovú sekvenciu: Gly Pro Pro Glu Val Gln Asn Ala Asn. Okrem toho sa riešenie týka činidiel na detegovanie uvedených močovopohlavných TLPs, ako aj farmaceutických zmesí.

## Peptidy komplexu TLP urogenitálneho karcinómu a ich protilátky

### Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka peptidov TLP komplexu (nádorom uvoľňované proteíny), izolovaných z karcinómu močovopohlavného ústrojenstva.

Vynález sa týka najmä peptidov proteínových komplexov TLP z karcinómu ľudského močovopohlavného ústrojenstva, majúcich antigénnu účinnosť a protilátok schopných reagovať s nimi, ktoré môžu byť použité na diagnostikovanie a na klinikách.

### Doterajší stav techniky

Komplexy TLP sú komplexy proteínov, ktoré sú prítomné v humánnych nádorových bunkách. Spomedzi TLP proteínov je opísaný proteín 214 kDa (Tarro, G.: Oncology 40, 248-253, 1983). TLP sú izolované z nádorových tkanív, ako je opísané v európskom patente EP 283443. Talianska patentová prihláška č. RM92A000506 identifikuje TLP proteín z pľúcneho nádoru.

Autor tohto vynálezu prekvapivo zistil, že TLP z močovopohlavného ústrojenstva obsahuje nové peptidy, ktoré majú sekvencie odlišné od známych TLP peptidov.

Preto existuje potreba identifikovať TLP peptidy, pôsobiace ako epitopy, z močovopohlavného karcinómu, kvôli vytvoreniu špecifických činidiel, ako sú protilátky.

### Podstata vynálezu

Autor predloženého vynálezu identifikoval peptid majúci sekvenciu obsiahnutú v sekvencii 214 kDa TLP proteínu buď z krčka maternice alebo z adenomatózneho karcinómu semenníkov a z neoplázie obličiek.

Podstata predloženého vynálezu sa preto týka peptidu, obsahujúceho špecifický TLP epitop močovopohlavného karcinómu, kde uvedený TLP je charakterizovaný obsahom aminokyselínovej sekvencie SEQ ID č.1:

Gly Pro Pro Glu Val Gln Asn Ala Asn.

Podľa výhodného riešenia peptid obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č.1.

Ďalším podstatným znakom predloženého vynálezu sú špecifické činidlá schopné rozoznať TLP z karcinómu močovopohlavného ústrojenstva, pričom uvedené činidlá s výhodou obsahujú TLP protilátky. Ešte výhodnejšie uvedené protilátky rozoznávajú peptidový fragment, ktorý má sekvenciu z SEQ ID č.1.

Ešte ďalším znakom tohto vynálezu sú diagnostické súpravy na identifikovanie TLP zo vzorky, obsahujúce ako špecifické činidlá protilátky podľa vynálezu.

Ďalšou podstatou vynálezu je farmaceutická zmes, obsahujúca ako účinnú zložku peptid podľa vynálezu.

### Príklady uskutočnenia

Vynález je ďalej opísaný pomocou doložených príkladov, ktoré sa však nemajú chápať ako obmedzujúce.

#### Pr í k l a d 1

##### Príprava nádorového extraktu

12,55 g nádorovej biopsie z karcinómu krčka maternice 45-ročnej ženy sa rozmrazilo pri teplote miestnosti a nekrotické tkanivá boli chirurgicky odstránené. Keď sa materiál stal homogénnym, viackrát sa premyl s Tris 1x (10 mM Tris-HCl, pH 7,2) a tkanivo sa vystavilo trom zmrazovacím a rozmrazovacím cyklom.

Použitý Tris premývací roztok sa zhromaždil a centrifugoval pri 33.000 obrátkach 1 hodinu. Supernatant sa pozberal a zmrazil.

Tkanivo sa vystavilo účinkom ultrazvuku trikrát po tri minúty a následne sa centrifugovalo pri 33.000 obrátkach 2 hodiny. Supernatant (5,7 ml) sa zhromaždil, prefiltraval filtračnými Agrodiskami (0,45 µm), tkanivo sa suspendovalo v množstve 1 g/ml Tris a ultracentrifugovalo pri 33.000 obrátkach 60 minút. Supernatant (0,5 ml) sa prefiltraval a pridal k predchádzajúcemu.

Rovnaký postup bol použitý pri vzorkách karcinómu semenníkov (celkový výt'azok 1,9 ml) alebo neoplázie obličiek.

## Príklad 2

Identifikácia peptidov obsiahnutých v TLP proteíne z karcinómu močovopohlavného ústrojenstva

TLP komplex bol izolovaný z extraktov karcinómu močovopohlavného ústrojenstva spôsobom, opísaným v EP 283443. Použitými vzorkami boli:

- 1) adenokarcinóm krčka maternice
- 2) semenníkový karcinóm
- 3) obličková neoplázia

Výsledný obsah proteínov je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1

vzorka	celkom mg	mg/ml TLP
adenokarcinóm krčka maternice	59,5	9,6
semenníkový karcinóm	7,4	3,9
obličková neoplázia	7,4	1,5

celková koncentrácia obličkového proteínu neumožnila účinnú TLP purifikáciu výt'ažku

TLP identifikácia sa uskutočnila stanovením molekulovej hmotnosti (214 kDa) prostriedkami denaturačnej elektroforetickej analýzy (SDS).

Odstránenie hlavnej časti kontaminantov sa uskutočnilo vyhotovením gélových sekcií zodpovedajúcich zrejmej molekulovej hmotnosti 214 kDa a ďalšou elektroelúciou mikroelektroelučným prístrojom (AMICON).

Čistota TLP bola následne potvrdená denaturačnou elektroforetickou analýzou. TLP sa potom preniesli na PVDF (polyvinylidifluoridovú) membránu s vysokou proteínovou viazacou aktivitou a vykonala sa sekvenčná aminokyselinová analýza podľa Edmanovej metódy na prístroji Applied Biosystems na automatické sekvencovanie proteínov.

Aminokyselinovou sekvenciou, ktorá bola nájdená vo všetkých vzorkách, bola nasledovná sekvencia:

Gly Pro Pro Glu Val Gln Asn Ala Asn (SEQ ID č.1).

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Peptid obsahujúci TLP špecifický močovopohlavný epitop, kde uvedený TLP obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č.1.
2. Peptid podľa nároku 1, zahrnujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID č.1.
3. Protilátka schopná rozoznať aspoň jeden peptid podľa nároku 1 alebo 2.
4. Diagnostická súprava na identifikovanie TLP z močovopohlavných nádorových vzoriek, zahrnujúca ako špecifické činidlo protilátku podľa nároku 3.
5. Spôsob identifikácie TLP komplexov z močovopohlavných nádorových vzoriek, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že pozostáva z nasledujúcich krokov:
  - imunoprecipitácia uvedenej vzorky s prvým alikvotným množstvom séra imúnneho voči peptidu podľa nároku 1 alebo 2;
  - detegovanie uvedených TLP komplexov z prvej imunoprecipitácie reakciou s druhým alikvotným množstvom uvedeného imúnneho séra a detegovanie prostriedku uvedenej reakcie.
6. Farmaceutická kompozícia, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje ako účinnú zložku peptid podľa nároku 1.

## Zoznam sekvencií

### (1) VŠEOBECNÉ INFORMÁCIE

#### (i) PRIHLASOVATEĽ:

(A) Meno: Istituto Farmacoterapico Italiano S.p.A.

(B) Ulica: Via Paolo Frisi 21/23

(C) Mesto: Rím

(E) Krajina: Taliansko

(F) Poštové smerovacie číslo (ZIP): 00197

(A) Meno: Tarro Giulio c/o Istituto Farmacoterapico Italiano S.p.A.

(B) Ulica: Via Paolo Frisi 21/23

(C) Mesto: Rím

(E) Krajina: Taliansko

(F) Poštové smerovacie číslo (ZIP): 00197

(ii) NÁZOV VYNÁLEZU: TLP komplex peptidov močovopohlavného karcinómu a jeho protilátky

(iii) POČET SEKVENCIÍ: 1

(iv) POČÍTAČOM ČITATEĽNÁ FORMA:

(A) Typ média: floppy disk

(B) Počítač: IBM PC kompatibilný

(C) Operačný systém: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: PatentIn Release # 1.0, Verzia # 1.30(EPO)

### (2) INFORMÁCIE PRE SEQ ID č.1:

(i) Sekvenčné charakteristiky:

(A) Dĺžka: 9 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(C) Vlákno: jednoduché

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID č.1:

Gly Pro Pro Glu Val Gln Asn Ala Asn

1

5