

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C07K 14/705

C07K 7/06 A61K 39/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97191213.0

[43]公开日 1999年1月13日

[11]公开号 CN 1205012A

[22]申请日 97.7.2 [21]申请号 97191213.0

[30]优先权

[32]96.7.10 [33]IT [31]RM96A000496

[86]国际申请 PCT/IT97/00158 97.7.2

[87]国际公布 WO98/01462 英 98.1.15

[85]进入国家阶段日期 98.5.7

[71]申请人 意大利法尔马科特拉皮克研究所公开有
限公司

地址 意大利罗马

[72]发明人 朱利奥·塔若

[74]专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司
代理人 王达佐

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 泌尿生殖癌 TLP 复合体肽及其抗体

[57]摘要

本文描述了含有特异泌尿生殖癌 TLP 表位的肽,其中 TLP 包含氨基酸序列 :Gly Pro Pro Glu Val Gln Asn Ala Asn。另外也描述了检测所述泌尿生殖 T LPs 的试剂及药物组合物。

9507

权 利 要 求 书

1. 包含 TLP 泌尿生殖特异性表位的肽,其中所述 TLP 包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列。

5

2. 根据权利要求 1 的肽, 该肽包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列。

3. 可识别至少一种根据权利要求 1 或 2 的肽的抗体。

10

4. 从泌尿生殖肿瘤样品中识别 TLP 的诊断试剂盒, 所述试剂盒包含根据权利要求 3 的作为特异试剂的抗体。

5. 从泌尿生殖肿瘤样品中识别 TLP 复合体的方法, 其特征在于包含以下步骤:

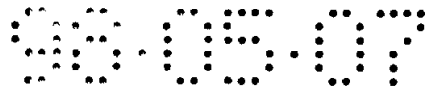
15

—用第一份抗权利要求 1 或 2 的肽的免疫血清对所述样品进行免疫沉淀;

—通过与第二份所述免疫血清进行反应以及用所述反应的检测方法从第一免疫沉淀物中检测所述 TLP 复合体。

20

6. 含有权利要求 1 的肽作为活性剂的药物组合物。



说明书

泌尿生殖癌 TLP 复合体肽及其抗体

5 本发明涉及从泌尿生殖器癌中分离出来的 TLP 复合体(肿瘤释放蛋白)的肽。

10 具体地讲, 本发明涉及来自人泌尿生殖器的具有抗原活性的 TLP 蛋白复合体的肽, 以及能与所述肽反应的抗体, 所述抗体可用于诊断及临床。

15 TLP 复合体是存在于人肿瘤细胞中的蛋白复合体。有人描述了一种 214KDa 的 TLP 蛋白(Tarro G., Oncology 40,248-253, 1983)。可用欧洲专利 283443 中所描述的方法来从肿瘤组织中分离 TLP。意大利专利申请 RM92A000506 从肺癌中识别了一种 TLP 蛋白。本发明的发明人惊奇地发现来自泌尿生殖器癌的 TLP 含有新肽, 这些新肽含有不同于已知 TLP 肽的序列。

20 因此, 需要从泌尿生殖癌中鉴别出起表位作用的 TLP 肽, 以制备作为抗体的特异试剂。

本发明的发明人已识别出具有一定序列的肽, 所述序列包含于来自子宫颈或睾丸腺癌、以及肾瘤的 214KDa 的 TLP 蛋白的序列中。

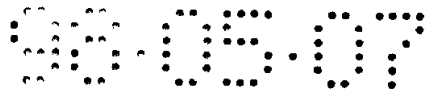
25 因此本发明的一个目的是提供含有特异性泌尿生殖癌 TLP 表位的肽, 其中所述的 TLP 的特征是含有 SEQ ID No.1 的氨基酸序列:

Gly Pro Pro Glu Val Gln Asn Ala Asn

30 按照优选实施方案, 其中的肽含有 SEQ ID No.1 的氨基酸序列。

本发明的再一目的是提供能从泌尿生殖癌中识别 TLP 的特异性试剂, 所述试剂优选含有 TLP 抗体。更优选地, 所述抗体可识别具有 SEQ ID No.1 序列的肽片断。

35



本发明的又一目的是提供诊断试剂盒,所述试剂盒含有本发明抗体作为特异性试剂,以从样品中识别 TLP。

5 本发明的另一目的是提供含有本发明肽作为活性剂的药物组合
物。

现在用说明性并非限制性的实例对本发明进行描述。

10 实施例 1 肿瘤浸出液的制备

将来自一患有子宫癌的 45 岁妇女的 12.55g 的肿瘤在室温下解冻,并且用外科方法除去坏死组织。当将所得到的物质匀化后,用 Tris 1 × (10mM Tris-HCl, pH7.2)进行多次洗涤,并且将该组织进行三轮冷冻-解冻循环。

15 收集使用过的 Tris 洗涤液并在 33,000rpm 下离心 1 小时。收集上清液并进行冷冻。

20 将组织用声波处理三次达 3 分钟,随后在 33,000 rpm 下超离心 120 分钟。收集上清液(5.7ml),在 Agrodisc 过滤器(0.45μm)上过滤,并将过滤后得的组织悬浮在 Tris 溶液中,比例为 1g/ml Tris,并将其在 33,000rpm 下超离心 60 分钟。过滤上清液(0.5ml)并将其加入上一次的上清液中。

25 对睾丸癌(总产量 1.9ml)及肾瘤样品进行同样的处理。

实施例 2 对来自泌尿生殖器癌的 TLP 蛋白中包含的肽的识别

如欧洲专利 283443 中所述,将 TLP 复合物从泌尿生殖器癌浸出液中分离出来。所使用的样品是:

- 30 1)子宫颈腺癌;
- 2)睾丸癌;
- 3)肾瘤。

所得到的蛋白含量如下:

35

表 1

样 品	总 mg 数	mg/ml TLP
子宫颈腺癌	59.5	9.6
睾丸癌	7.4	3.9
肾瘤	7.4*	1.5

*总肾蛋白浓度不允许足够的 TLP 纯化产量。

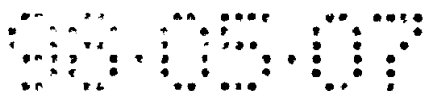
5 用变性电泳分析方法(SDS)，通过分子量测定(214KDa)来进行 TLP 识别。

通过取下相应于表观分子量 214kDa 的凝胶部分并进一步用电洗脱仪(AMICON)进行电洗脱以去除大部分的污染物。

10 随后通过变性电泳分析确定 TLP 的纯度。然后将 TLP 移至具有很高的蛋白质结合能力的 PVDF(聚二氟乙烯 (Polyvinylidifluoride))膜上，再用 Applied Biosystems 的蛋白质自动测序仪按照 Edman 方法进行氨基酸序列分析。

15 在所有样品中发现的氨基酸序列如下：

Gly Pro Pro Glu Val Gln Asn Ala Asn(SEQ ID No.1)



序列表

(1) 一般信息

(i) 申请人

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

5 (B) 街道: Via Paolo Frisi 21/23

(C) 城市: 罗马

(E) 国家: 意大利

(F) 邮政编码(ZIP): 00197

10 (A) 名称: Tarro Giulio c/o Istituto Farmacoterapica Italiano
S.p.A.

(B) 街道: Via Paolo Frisi 21/23

(C) 城市: 罗马

(E) 国家: 意大利

(F) 邮政编码(ZIP): 00197

15 (ii) 发明名称: 泌尿生殖癌 TLP 复合体肽及其抗体

(iii) 序列数: 1

(iv) 计算机可读形式:

(A) 媒体类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

20 (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: Patentin Release #1.0, Version #1.30(EPO)

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

25 (A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

30 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

Gly Pro Pro Glu Val Gln Asn Ala Asn

1

5