



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900530774
Data Deposito	10/07/1996
Data Pubblicazione	10/01/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C		

Titolo

PEPTIDI DEI COMPLESSI TLP DA CARCINOMI DELL'APPARATO UROGENITALE E
ANTICORPI DIRETTI CONTRO DI ESSI

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione dal titolo:

"Peptidi dei complessi TLP da carcinomi dell'apparato urogenitale
e anticorpi diretti contro di essi"

a nome: ISTITUTO FARMACOTERAPICO ITALIANO S.p.A.

inventore: Tarro Giulio

La presente invenzione concerne peptidi del complesso TLP (proteine rilasciate da tumori) da carcinomi dell'apparato urogenitale.

Più in particolare l'invenzione riguarda peptidi dei complessi proteici TLP da carcinomi dell'apparato uro-genitale umani con attività antigenica e anticorpi che reagiscono con essi, da utilizzarsi per la diagnostica e per la clinica.

I complessi TLP sono complessi proteici presenti in cellule tumorali umane. Tra le proteine TLP è descritta una proteina di 214 KDa (Tarro G., Oncology 40, 248-253, 1983). Le TLP sono isolate da tessuti tumorali come descritto nel brevetto EP 283443. la domanda di brevetto RM92A000506 identifica una proteina TLP da carcinoma polmonare. L'autore della presente invenzione ha ora sorprendentemente trovato che TLP da carcinomi dell'apparato uro-genitale comprendono peptidi di sequenza differente da quelli già identificati.

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

Risulta pertanto evidente l'esigenza di identificare tali peptidi di TLP (epitopi) da carcinomi dell'apparato uro-genitale per la produzione di reagenti specifici, come anticorpi.

L'autore della presente invenzione ha identificato un peptide di sequenza compresa nella proteina di 214 kDa TLP da adenocarcinoma del collo dell'utero, da carcinoma del testicolo e da neoplasia del rene.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un peptide comprendente un epitopo specifico per TLP del carcinoma uro-genitale, in cui il TLP è caratterizzato dal fatto di comprendere la seguente sequenza amminoacidica:

GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn.

Secondo una forma preferita di attuazione il peptide dell'invenzione comprende la sequenza amminoacidica descritta.

Costituiscono oggetto della presente invenzione reagenti specifici capaci di riconoscere le proteine TLP, preferibilmente detti reagenti comprendono anticorpi. Preferibilmente detti anticorpi riconoscono il frammento peptidico avente la sequenza:

GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn.

Ulteriore oggetto dell'invenzione sono corredi diagnostici per l'identificazione di TLP da campioni comprendenti come reagenti specifici gli anticorpi secondo l'invenzione.

La presente invenzione verrà ora descritta in suoi esempi esplicativi.

Ing. Baranò & Baranò
Roma s.p.a.

Esempio 1 Preparazione dell'estratto tumorale

Una biopsia tumorale, del peso di 12,55 g, da una paziente di 45 anni affetta da adenocarcinoma del collo dell'utero veniva scongelata a temperatura ambiente e si procedeva all'eliminazione delle parti necrotiche chirurgicamente. Quando il materiale diventava omogeneo, si effettuavano lavaggi con soluzione Tris 1x (10 mM Tris-HCl pH 7.2) e fasi di congelamento e scongelamento (3 volte).

Nel frattempo, il liquido ottenuto dai lavaggi con Tris veniva raccolto e centrifugato a 33.000 rpm per 1 ora. Il sovranatante veniva raccolto e congelato.

Il tessuto veniva sonicato per tre volte per tre min., e successivamente ultracentrifugato a 33.000 rpm per 120 min. Il sovranatante (5,7 ml) veniva raccolto, filtrato con filtri Agrodisc (0.45µm), mentre il tessuto veniva risospeso ad un rapporto di 1g/ml di Tris e ultracentrifugato a 33.000 rpm per 60 min. il sovranatante (0.5 ml) veniva filtrato e aggiunto a quello precedente.

Lo stesso procedimento era adottato per campioni di carcinoma del testicolo (resa totale di 1.9 ml) e di neoplasia del rene.

Esempio 2 Identificazione di peptidi compresi nella proteina TLP da carcinomi dell'apparato uro-genitale

*Ing. Barzani G. Barzani
Roma s.p.a.*

Il complesso TLP è isolato da estratti di carcinoma dell'apparato uro-genitale come descritto nel brevetto EP 283443. I campioni utilizzati sono stati:

- 1) adenocarcinoma del collo dell'utero;
- 2) carcinoma del testicolo;
- 3) neoplasia del rene.

Il dosaggio del contenuto proteico è risultato:

campione	mg totali	mg/ml TLP
adenocarcinoma del collo dell'utero	59,5	9,6
carcinoma del testicolo	7,4	3,9
neoplasia del rene	7,4*	1,5

* la concentrazione delle proteine totali da rene non ha permesso una efficiente resa di purificazione della TLP.

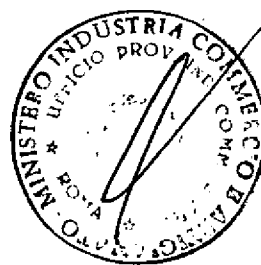
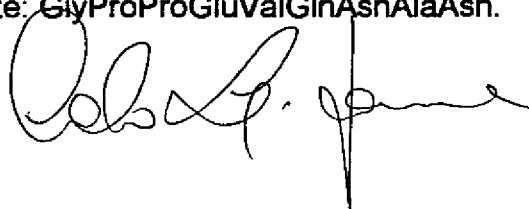
In breve l'identificazione del TLP è stata effettuata mediante determinazione del peso molecolare (214 kDa) attraverso analisi elettroforetica in condizioni denaturanti (SDS).

La rimozione della maggior parte dei contaminanti è stata effettuata rimuovendo dal gel le bande proteiche corrispondenti ad un peso molecolare apparente di 214 kDa e mediante successiva elettroleuizione con un microelettroleuitore dell'AMICON.

Ing. Barxano & Barxano
Roma s.p.a.

Dopo questo passaggio la purezza del TLP veniva controllata mediante elettroforesi in condizioni denaturanti. Veniva pertanto trasferito su una membrana di PVDF (polivinilidefluoruro) ad alta ritenzione proteica e sottoposto all'analisi amminoacidica sequenziale di Edman, utilizzando un sequenziatore automatico di proteine della Applied Biosystems.

La sequenza amminoacidica comune ai campioni è la seguente: GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn.



Ing. Barzano & Barano
Roma s.p.a.

RIVENDICAZIONI

1. Peptide comprendente un epitopo specifico per TLP del carcinoma uro-genitale, in cui il TLP è caratterizzato dal fatto di comprendere la seguente sequenza amminoacidica:

GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn.

2. Peptide secondo la rivendicazione 1 comprendente la seguente sequenza amminoacidica:

GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn.

3. Anticorpo in grado di riconoscere almeno un peptide secondo una delle rivendicazioni 1 o 2.

4. Corredo diagnostico per l'identificazione di TLP da campione tumorale dell'apparato uro-genitale comprendente come reagente specifico l'anticorpo secondo la rivendicazione 3.

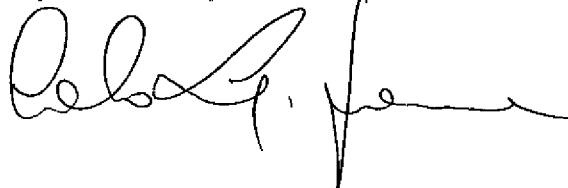
5. Procedimento per l'identificazione di complessi TLP da campione tumorale dell'apparato uro-genitale caratterizzato dal fatto di comprendere le seguenti fasi:

- immunoprecipitare detto campione con una prima aliquota di siero immune contro il peptide secondo una delle rivendicazioni 1 o 2;
- evidenziare detti complessi TLP dal primo immunoprecipitato a mezzo di reazione con una seconda aliquota di detto siero immune contro TLP e con un mezzo rivelatore di detta reazione.

10 LUG. 1996

p.p. Istituto Farmacoterapico Italiano S.p.A.

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



OC

per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannoni
(N° d'iscr. 456)



*Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.*