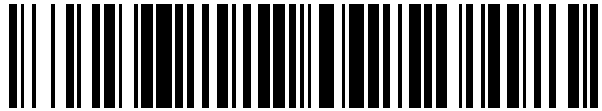


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 804**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2010 E 10763018 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2475685**

54 Título: **Un péptido monofosforilado aislado derivado de alfa-enolasa humana útil para diagnóstico y tratamiento del adenocarcinoma pancreático, anticuerpos dirigidos contra dicho péptido monofosforilado, y sus usos**

30 Prioridad:

11.09.2009 IT TO20090697

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.03.2014

73 Titular/es:

NOVELLI, FRANCESCO (50.0%)

Corso Orbassano 78

10136 Torino, IT y

NATIMAB THERAPEUTICS S.R.L. (50.0%)

72 Inventor/es:

NOVELLI, FRANCESCO;

TOMAINO, BARBARA y

CAPPELLO, PAOLA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 448 804 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un péptido monofosforilado aislado derivado de alfa-enolasa humana útil para diagnóstico y tratamiento del adenocarcinoma pancreático, anticuerpos dirigidos contra dicho péptido monofosforilado, y sus usos

5

Campo de la invención

La presente invención está en el campo del diagnóstico y tratamiento de enfermedades tumorales y en particular, del adenocarcinoma ductal pancreático, también denominado ACDP.

10

Más específicamente, la presente invención se refiere a un péptido monofosforilado aislado derivado de la alfa-enolasa humana y a un anticuerpo dirigido específicamente contra el mismo, útil en el diagnóstico y/o tratamiento del adenocarcinoma ductal pancreático. Además, la invención hace referencia a una isoforma monofosforilada de alfa-enolasa humana que comprende el péptido monofosforilado mencionado anteriormente.

15

Antecedentes de la invención

El ACDP es el carcinoma pancreático más frecuente y es la cuarta causa de muerte en Estados Unidos y Europa. La mayoría de los pacientes mueren en un plazo de doce meses y el porcentaje de supervivencia a cinco años desde el diagnóstico es del 2 %. La pancreatometomía sigue siendo el tratamiento principal del ACDP, pero los beneficios de la misma están restringidos al 20 % de los casos en los que el diagnóstico se realizó en una etapa precoz. A pesar de las mejoras en los tratamientos médicos y quirúrgicos, incluido el uso de anticuerpos monoclonales, vacunas y quimioterapia, hasta ahora se dispone de muy pocos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del ACDP, que además son poco fiables. El biomarcador serológico del ACDP más usado es el antígeno sialilado del grupo sanguíneo de Lewis CA19.9, que se usa principalmente para monitorizar la respuesta a la terapia. Este antígeno puede estar presente eficazmente a concentraciones altas, incluso en el suero de pacientes con enfermedades pancreáticas benignas como la pancreatitis crónica y la obstrucción biliar, lo que tiene como resultado falsos positivos. Además, este antígeno no se expresa en el 5-10 % de la población y por tanto no es adecuado para usar en todos los pacientes de ACDP.

20

25

30

Por estas razones, se están investigando biomarcadores alternativos para el diagnóstico del ACDP.

La identificación de un biomarcador que sea fiable y útil en un elevado porcentaje de pacientes permitiría disminuir el uso de procedimientos invasivos, tales como obtenciones mediante biopsia y exploraciones histopatológicas. También se podría usar un biomarcador con estas características para identificar y evaluar nuevos candidatos a fármacos para el tratamiento del ACDP.

35

El análisis a gran escala de la expresión de proteínas y ARN está entre las tecnologías de uso más reciente para identificar posibles biomarcadores de ACDP. En concreto, se han usado las tecnologías proteómicas para identificar antígenos capaces de inducir una respuesta de anticuerpos en los pacientes con ACDP. Esto se ha realizado analizando perfiles proteicos separados mediante electroforesis bidimensional (2-DE), reconocidos por el suero de pacientes con ACDP e identificados después mediante espectrometría de masas. Caracterizando el repertorio de los linfocitos B contra antígenos expresados específicamente por células tumorales (los denominados inmunomas del cáncer humano), puede ser posible definir dianas específicas que estén implicadas en investigaciones inmunológicas e inmunomodificaciones tumorales y entender los mecanismos responsables de la proliferación celular incontrolada y la metástasis.

40

45

Determinados autores han sugerido que la inmunoterapia puede ser un abordaje practicable para el cáncer pancreático. En realidad, se han generado listas de proteínas específicas del ACDP según su expresión elevada a nivel de ARN (documento WO 2004/055519) o en base a los análisis proteómicos a gran escala o proteómicos-serológicos usando sueros de pacientes con ACDP. No obstante, en lo que respecta a lo que saben los autores de la invención, no se ha demostrado que ninguna de estas proteínas concretas sea útil como un reactivo diagnóstico específico para el ACDP.

50

En la solicitud internacional de patente WO 2008037792, se comunica la existencia de seis isoformas de la alfa-enolasa humana fosforilada (ENOA1-6) diferentes y el uso de una de estas isoformas, fosforilada al menos en tres posiciones, se ha reivindicado para el diagnóstico del ACDP. La descripción del documento WO 2008037792 muestra datos experimentales concernientes al análisis de la fosforilación de la isoforma ENOA3, pero esta isoforma realmente no está relacionada con el ACDP. Por el contrario, las isoformas ENOA1 y ENOA2 -relacionadas con el ACDP- no están suficientemente caracterizadas en términos estructurales y no se ha proporcionado ningún criterio inequívoco para distinguir las de las isoformas no relacionadas con el ACDP.

55

60

Por tanto, sigue existiendo una necesidad de detectar y caracterizar un biomarcador que sea específico y fiable para el diagnóstico precoz del ACDP, diseñado para distinguir esta grave enfermedad tumoral de otras patologías.

65

Sumario de la invención

Estos y otros objetos se consiguen mediante un péptido monofosforilado aislado de la alfa-enolasa de una longitud de 12 a 20 aminoácidos, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos RIEEELGSKAKF (SEC ID N.º: 1), de modo que dicho péptido contiene una única fosforilación en el residuo de serina (S) en la posición 8 de la SEC ID N.º: 1.

Como ilustración se proporciona una isoforma de la alfa-enolasa humana monofosforilada, caracterizada porque comprende la secuencia de aminoácidos comprendida entre las posiciones 2 y 434 de la SEC ID N.º: 2, de modo que dicha isoforma contiene una única fosforilación en el residuo de serina (S) en la posición 419 de la SEC ID N.º: 2.

La SEC ID N.º: 2 es la secuencia de aminoácidos de la alfa-enolasa humana disponible en la base de datos de UniProtKB con el número de registro P06733.

La SEC ID N.º: 1 corresponde a las posiciones de aminoácidos de 412 a 423 de la SEC ID N.º: 2.

El residuo de serina en la posición 8 de la SEC ID N.º: 1 corresponde al residuo de serina en la posición 419 de la SEC ID N.º: 2.

En la descripción siguiente, el péptido aislado que forma el objeto de la presente invención se denominará "péptido monofosforilado".

Un aspecto adicional de la invención es un anticuerpo diseñado para unirse específicamente al péptido monofosforilado y/o a la isoforma monofosforilada de la invención.

Otro aspecto más de la invención es un kit para el diagnóstico del adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), que comprende como un reactivo específico una molécula proteica relacionada específicamente con el ACDP seleccionada del péptido monofosforilado aislado de la invención y anticuerpos diseñados para unirse específicamente al péptido monofosforilado de la invención.

Otro aspecto más de la invención es un método de inmunoensayo para el diagnóstico del ACDP, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra biológica (preferentemente suero o sangre) de un paciente del que se sospecha que está afectado por adenocarcinoma ductal pancreático con el péptido fosforilado de la invención;

b) detectar si se produce una unión inmunológica específica entre el péptido y autoanticuerpos posiblemente presentes en la muestra biológica del paciente; siendo la aparición de dicha unión inmunológica específica indicativa de adenocarcinoma ductal pancreático.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de un anticuerpo diseñado para unirse específicamente al péptido monofosforilado de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico del ACDP.

Otras características de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas que son parte integral de la descripción.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la observación, realizada por los autores de la presente invención mediante la técnica de espectrometría de masas (EM), de que las isoformas de la alfa-enolasa humana que contienen una única fosforilación en el residuo de serina (S) en la posición 419 de la SEC ID N.º: 2 se expresan de forma selectiva en el páncreas tumoral en comparación con el páncreas sano.

Dicho hallazgo es sorprendente sobre todo considerando el documento WO 2008/037792 de la técnica anterior, en el que se enseña que las isoformas de la alfa-enolasa humana ENOA1 y ENOA2, relacionadas específicamente con el adenocarcinoma pancreático, están fosforiladas en al menos 3 posiciones.

Los autores de la presente invención también han verificado que un péptido aislado, de una longitud de 12 a 20 aminoácidos, derivado de la alfa-enolasa humana, que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 1, únicamente fosforilada en el residuo serina (S) en la posición 8 de la SEC ID N.º: 1, se reconoce específicamente por los autoanticuerpos de tipo IgG presentes en el suero de pacientes afectados por el ACDP pero ausentes de los sueros de individuos sanos y de los sueros de individuos afectados por otras patologías pancreáticas.

En conjunto, estos hallazgos han permitido a los autores de la invención establecer un inmunoensayo *in vitro* rápido y fiable para el diagnóstico del ACDP.

En el contexto de la presente descripción, el término “diagnóstico” quiere decir la identificación de la enfermedad y/o la valoración de su progresión, así como, opcionalmente, la evaluación de la respuesta del paciente a la terapia a través de la detección de autoanticuerpos diseñados para reconocer específicamente el péptido monofosforilado que forma el objeto de la presente invención.

5 El péptido monofosforilado de la invención se sintetizó en fase sólida y se conjugó con un vehículo a través de un residuo de cisteína adicional en la posición amino terminal. Para ello, se puede usar cualquier técnica de conjugación y de síntesis de péptidos conocida *per se*.

10 En la sección experimental siguiente se proporciona un ejemplo ilustrativo y no limitante de la síntesis en fase sólida del péptido monofosforilado de la invención y la conjugación del mismo con ovoalbúmina (OVA) de pollo como vehículo. La conjugación con el vehículo permite una fácil unión al soporte sólido usado para conformar el ensayo *in vitro* permitiendo al mismo tiempo que el péptido se doble en el espacio y sea accesible para unirse a los anticuerpos. Ejemplos no limitantes de vehículos aparte de ovoalbúmina de pollo son los siguientes: seroalbúmina bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana, proteína de unión a la maltosa de *E. coli*, poliarginina, polihistidina, glutatión-S-transferasa y similares.

20 Como se ilustrará con mayor detalle en la sección experimental, los autores de la invención sintetizaron dos péptidos, consistentes ambos en la secuencia de aminoácidos CRIIEELGSKAKF (SEC ID N.º: 3), uno de los cuales contiene una única fosforilación en el residuo de serina y el otro está desprovisto de cualquier tipo de fosforilación. El péptido no fosforilado de SEC ID N.º: 3 se usó para evaluar la especificidad de la reactividad de los anticuerpos contra el péptido monofosforilado de SEC ID N.º: 3.

25 Tanto el péptido monofosforilado de SEC ID N.º: 3 como el péptido no fosforilado de SEC ID N.º: 3 se conjugaron con ovoalbúmina (OVA) de pollo y se inmovilizaron sobre microplacas como los soportes para llevar a cabo el inmunoensayo. Un experto en la técnica es capaz de sustituir la microplaca con cualquier soporte sólido adecuado para llevar a cabo un inmunoensayo, tal como, por ejemplo, un soporte de poliestireno, sílice o nitrocelulosa.

30 Los sueros de sujetos sanos y de pacientes afectados por ACDP se incubaron previamente con OVA, disponible comercialmente en, por ejemplo, Pierce (Rockford, IL, EE.UU.), con el fin de eliminar los anticuerpos dirigidos contra el vehículo, tras lo que se hicieron reaccionar con el péptido monofosforilado de la SEC ID N.º: 3 y el péptido no fosforilado de la SEC ID N.º: 3, ambos en forma conjugada con ovoalbúmina e inmovilizados en los pocillos de la microplaca. La presencia de autoanticuerpos de tipo IgG capaces de reconocer específicamente el péptido monofosforilado de SEC ID N.º: 3 en los sueros analizados se detectó con un anticuerpo policlonal de tipo IgG anti-humana de conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante. Un experto en la técnica es capaz de sustituir dicho sistema de detección con cualquier sistema de detección alternativo adecuado para usar en un inmunoensayo, preferentemente un ensayo inmunoenzimático, tal como, por ejemplo, un ensayo ELISA o EIA, o un radioinmunoensayo (RIA).

40 La tabla 1 muestra los resultados obtenidos en términos de reactividad de los sueros de sujetos sanos (SS), pacientes de ACDP y pacientes con tumores diferentes de los derivados de páncreas (sin ACDP), contra el péptido monofosforilado de SEC ID N.º: 3 y el péptido no fosforilado de SEC ID N.º: 3.

Tabla 1

Sujetos	CRIIEELG(Sp)KAKF		CRIIEELGSKAKF	
	D.O. ($x \pm sem$)	Frecuencia de sujetos con D.O. > SS	D.O. ($x \pm sem$)	Frecuencia de sujetos con D.O. > SS
SS (n = 33)	0,9 ± 0,06	0	1,35 ± 0,06	0
ACDP (n = 122)	1,42 ± 0,05	79	1,57 ± 0,04	52
Sin ACDP (n = 27)	0,41 ± 0,03	0	0,44 ± 0,03	0

45 x = media; sem = error estándar de la media

50 La presencia de autoanticuerpos específicos contra el péptido monofosforilado de SEC ID N.º: 3 en los sueros analizados se evaluó en los pacientes de ACDP y se comparó con los sujetos sanos (SS) y los pacientes afectados por tumores no pancreáticos (sin ACDP). Se observó que la presencia de autoanticuerpos capaces de unirse al péptido monofosforilado de SEC ID N.º: 3 era significativamente mayor en los sueros de ACDP que en los sueros de sujetos sanos y sueros de sujetos sin ACDP. El porcentaje de pacientes con ACDP que, al superar el umbral de la D.O. media + error estándar de los sujetos sanos (SS), se consideró positivo para la presencia de anticuerpos específicos anti-péptido monofosforilado de SEC ID N.º: 3 alcanza el 79 %.

55 El péptido monofosforilado de SEC ID N.º: 3 se sometió a análisis *in silico* usando el motor de búsqueda Expasy (<http://www.uniprot.org/>) y se observó que la fosforilación era un acontecimiento peculiar del ACDP, ya que no se describe en ningún otro animal, planta u organismo bacteriano. En su lugar, la presencia de autoanticuerpos

capaces de reconocer específicamente el péptido no fosforilado de SEC ID N.º: 3 tuvo como resultado tanto en donantes sanos como en pacientes con ACDP y no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos, aún cuando el 52 % de los pacientes de ACDP mostró una D.O. más alta que el umbral de D.O. + error estándar de la media de los sujetos sanos.

5 La secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 3 se insertó en Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y se alineó con todas las secuencias incluidas en la base de datos.

10 La alineación mostró que los 13 aminoácidos que forman esta secuencia no solo son comunes a las alfa-enolasas de otras especies (por ejemplo, bacterias, ratón, rata) sino a otras proteínas también, lo que explica la elevada reactividad de los sueros contra el péptido no fosforilado de SEC ID N.º: 3.

15 Los resultados obtenidos por los autores de la presente invención demuestran que el péptido monofosforilado de la invención es capaz de capturar autoanticuerpos alfa-enolasa antimonofosforilados que están presentes en casi el 80 % de los pacientes con ACDP pero ausentes en los sujetos sanos. Esto indica que el péptido monofosforilado de la invención es una herramienta diagnóstica eficaz para el adenocarcinoma pancreático humano.

20 Como se ha mencionado anteriormente, un objeto adicional de la presente invención es un anticuerpo diseñado para unirse específicamente al péptido monofosforilado de la invención.

25 En el contexto de la presente descripción, el término anticuerpo comprende tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales. El término anticuerpo también comprende inmunoglobulinas enteras (preferentemente IgG) o cualquier fragmento o derivado de las mismas que tenga la misma especificidad de unión que la inmunoglobulina entera.

Un anticuerpo monoclonal se puede obtener mediante cualquier técnica conocida *per se*, tal como por ejemplo la técnica del hibridoma o la técnica de inmortalizar linfocitos B, de pacientes con un título de anticuerpos elevado, con el virus de Epstein Barr, que permite obtener anticuerpos monoclonales humanos.

30 Dado que la isoforma monofosforilada de la alfa-enolasa como se ha definido anteriormente comprende el péptido monofosforilado de la invención dentro de su propia secuencia de aminoácidos, también es probable que los anticuerpos dirigidos contra el péptido monofosforilado aislado sean capaces de unirse a la isoforma monofosforilada en la misma secuencia de aminoácidos.

35 Un anticuerpo tal, dirigido específicamente contra el péptido monofosforilado y también capaz de reconocer la isoforma monofosforilada de la alfa-enolasa, es particularmente adecuado para usar como un reactivo diagnóstico específico, ya que podrá unirse de forma selectiva a los tejidos que expresan las isoformas de la alfa-enolasa humana relacionadas con el ACDP. Será posible detectar una unión tal mediante cualquier técnica de detección *in vitro* o *in situ* conocida *per se*. Para una detección diagnóstica, se prefiere la detección *in situ*, lo que no implica la necesidad de obtener biopsias con procedimientos invasivos. Una técnica de detección *in situ* es por ejemplo la técnica de imagen, que comprende conjugar el anticuerpo con una molécula detectable adecuada, tal como por ejemplo un pigmento fluorescente.

45 Cuando se usa para diagnóstico, la molécula proteica relacionada específicamente con el ACDP (es decir, el péptido monofosforilado aislado, la isoforma monofosforilada de la invención y el anticuerpo dirigido específicamente contra los mismos) se proporciona como un kit diagnóstico. Además del reactivo específico, el kit diagnóstico comprende opcionalmente medios de detección e instrucciones para llevar a cabo el ensayo diagnóstico.

50 Un anticuerpo dirigido específicamente contra la isoforma monofosforilada de la invención también es adecuado para usar en el tratamiento terapéutico del ACDP, dado que la generación de un anticuerpo citotóxico (es decir, activación del anticuerpo o citotoxicidad dependiente del complemento) podría mediar en la eliminación selectiva de células de ACDP que se caracterizan porque expresan la isoforma monofosforilada de la α -enolasa. Por tanto, una composición farmacéutica para el tratamiento terapéutico del ACDP, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido específicamente a la isoforma monofosforilada de la invención y vehículos, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables opcionales, entra dentro del alcance de la presente invención. La composición se puede administrar en (a) una o múltiples dosis y/o usando dispositivos adecuados, a través de diversas vías de administración tales como por ejemplo por vía intramuscular, intravenosa, subcutánea, tópica, mucosa, dentro de matrices no biodegradables o usando sistemas de liberación de fármaco adecuados. En particular, la composición farmacéutica de la invención es adecuada para alcanzar la administración del principio activo a nivel del páncreas o en cualquier otro tejido que pueda expresar las proteínas específicamente asociadas con el ACDP.

65 Mediante la técnica de espectrometría de masas ha sido posible caracterizar dicha isoforma con respecto a modificaciones postraduccionales. Por tanto, se vio que las isoformas de la alfa-enolasa relacionadas con el ACDP humano (que en el documento WO 2008/037792 se denominaron ENOA1 y ENOA2) comparten el siguiente patrón de modificación postraduccional:

i) una única fosforilación en el residuo de serina en la posición 419 de la SEC ID N.º: 2;

ii) acetilación en el residuo de lisina en la posición 420 de la SEC ID N.º: 2;

5

iii) acetilación en el residuo de lisina en la posición 81 de la SEC ID N.º: 2;

iv) metilación en el residuo de ácido glutámico en la posición 88 de la SEC ID N.º: 2.

10 La deducción del patrón de modificación postraduccional característico de estas isoformas relacionadas con el ACDP permite distinguirlas de forma inequívoca de las isoformas no relacionadas con el ACDP restantes, tales como, por ejemplo, ENOA3.

15 Dicha isoforma también es adecuada para usar en un ensayo de detección selectiva para evaluar la reactividad de los anticuerpos anti-alfa-enolasa humana como herramientas terapéuticas o diagnósticas para el ACDP.

La siguiente sección experimental se proporciona únicamente a modo de ilustración y no se pretende que limite de ningún modo el alcance de la presente invención según se define en las reivindicaciones adjuntas.

20 Sección experimental

1) Síntesis peptídica

25 Los péptidos fosforilados y no fosforilados de SEC ID N.º: 3 se prepararon mediante el método de síntesis peptídica en fase sólida de Fmoc (SPSP), que comprende la adición sucesiva de aminoácidos con el fin de crear una cadena peptídica lineal (Merrifield, R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154; Carpino, L.A. & Han, G.Y. (1970) The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. J. Am. Chem. Soc. 92, 5748-5749). El extremo C de la cadena se unió de forma covalente a un soporte sólido, es decir la resina de HMP (4-hidroximetilfenoximetil-RAPP-Polímero). Los aminoácidos se derivaron para evitar que se produjeran reacciones secundarias indeseables y se protegieron sobre el alfa-NH₂ con el grupo Fmoc (9-fluorenilmetilcarbonilo). Durante la desprotección, el grupo Fmoc se eliminó con piperidina (Biosolve/Sigma), para permitir que se produjeran reacciones sucesivas entre el grupo alfa-NH₂ del péptido unido a la resina y el aminoácido activado.

35 La síntesis se realizó con un sintetizador peptídico automatizado (Symphony, Protein Technologies). Se usó una escala de síntesis de 25 µmoles, la cantidad en peso del aminoácido en cada cartucho fue de 75 µmoles.

Cada aminoácido se activó durante 10 minutos con HBTU/HOBt 0,2 M en DMF y DIEA 0,4 M en DMF.

40 Todos los aminoácidos estándar están disponibles comercialmente y se adquirieron en AGTC Bioproducts, mientras que los no estándar, tales como, por ejemplo, los aminoácidos fosforilados (Ser, Tyr, Thr) se adquirieron en Iris Biotech o Novabiochem. En cada etapa se usó dimetilformamida (DMF) como el disolvente. La desprotección (eliminación del grupo Fmoc) se llevó a cabo en aproximadamente 20 minutos con piperidina al 20 % en DMF. El tiempo de conjugación fue de 30 minutos.

45

Una vez que la síntesis se hubo completado, el enlace entre la resina y el péptido se rompió usando una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 95 %/H₂O al 2,5 %/trisiopropilsilano al 2,5 % durante al menos 1,5 horas, con eliminación simultánea de todos los grupos protectores de cadenas laterales.

50 Finalmente, los péptidos libres se precipitaron en éter dietílico. El volumen del éter fue 10 veces el volumen del TFA usado para la rotura.

Después del desprendimiento del soporte sólido, los péptidos aislados se pasaron por una columna de HPLC analítica de fase inversa de C18 (Vydac) en las condiciones siguientes: C18; A = H₂O/B al 0,3 %/TFA al 0,1 %; B = acetonitrilo al 50 %/H₂O al 50 %/TFA al 0,1 %; Gradiente: de A al 95 %-B al 5 % a B al 85 % en 30'.

55

La purificación se llevó a cabo con un sistema de Shimadzu para HPLC preparativas.

60 Los péptidos purificados se conjugaron con la proteína transportadora de ovoalbúmina de pollo mediante el método reticulador Sulfo-SMCC (Tsao JL, Lin X, Lackland H, Tous G, Wu YL, Stein S. (1991). Internally standardized amino acid analysis for determining peptide carrier protein coupling ratio. Anal. Biochem. 197: 137-142). Este método usa el grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína y se prefiere sobre la conjugación de acuerdo con el método del glutaraldehído en el que la secuencia peptídica contiene otros grupos amino, tales como por ejemplo las cadenas laterales de la lisina. Con el fin de aplicar el método de Sulfo-SMCC, es importante tener una cisteína en el extremo C o el extremo N de la secuencia peptídica. Esto asegura la conjugación selectiva de la proteína transportadora de un modo preciso sobre el grupo -SH de la cisteína para proporcionar un conjugado péptido/vehículo 1:1.

65

La conjugación se realizó colocando el conjugado preformado de OVA (Pierce) + Sulfo-SMCC (Sigma) en tampón PBS (pH 7,4) con el péptido a temperatura ambiente durante 4/5 horas. Tras esto, la solución se sometió a diálisis sobre una membrana de celulosa para eliminar el péptido no reaccionado y OVA. En la última etapa, el conjugado OVA-péptido se purificó mediante filtración en gel en una columna Sephadex (Amersham).

2) Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) para detectar IgG humanas específicas contra el péptido monofosforilado de la invención

Placas de microtitulación EIA/RIA stripwell™ (Costar Lifesciences, n.º de cat. 2580, Acton, MA, EE.UU.) se revistieron por triplicado con 50 µl de péptido monofosforilado de ovoalbúmina de pollo del conjugado de la invención ("OVA-fosfopéptido) diluido en PBS 1X a pH 7,3 a 1 µg/ml y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente (TA). Las filas se lavaron 3 veces con PBS y los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 200 µl/pocillo de PBS que contiene seroalbúmina bovina al 4 % (Sigma, S. Louis, MI, EE.UU.) durante 1,5 horas a TA y se lavaron 4 veces con PBS 1X que contiene Tween 20 al 0,05 % (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España) (PBS-Tween).

De forma concurrente, cada suero diluido a 1:100 se preincubó en una solución de PBS-Tween que contiene BSA al 1 % y OVA de pollo al 2,5 % (Sigma, n.º cat. A5378) en tubos de 0,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 30 minutos a 37 °C y después se añadió (50 µl) a la fila revestida durante 2 horas a TA. Después de 8 lavados con PBS-Tween, las filas se incubaron con el anticuerpo policlonal de tipo IgG anti-humano de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Santa Cruz, Biotechnology Inc., Santa Cruz, Ca, EE.UU.) diluido en PBS-Tween que contiene BSA al 1 % durante 1 hora a TA. Después de 6 lavados con PBS-Tween y 2 lavados con PBS 1X, el sustrato tetrametilbencidina (TMB, BioFX Laboratories, Owings Mills, MD, EE.UU.) se añadió a las filas y se dejó desarrollar la reacción coloreada a TA. La reacción se detuvo con ácido clorhídrico 2N y las placas se leyeron a 450 nm con un lector de microplacas M550 (BioRad, Segrate, Italia).

Referencias

- Documento WO 2004/055519
- Documento WO 2008/037792
- Merrifield, R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154
- Carpino, L.A. y Han, G.Y. (1970) The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. J. Am. Chem. Soc. 92, 5748-5749
- Tsao JL, Lin X, Lackland H, Tous G, Wu YL, Stein S. (1991). Internally standardized amino acid analysis for determining peptide carrier protein coupling ratio. Anal. Biochem. 197:137-142
- Tomaino B, Cappello P, Capello M y col. Autoantibody Signature in Human Ductal Pancreatic Adenocarcinoma. J Proteome Res 2007; 6: 4025-31
- Shevchenko, A., Jensen O.N., Podtelejnikov, A.C., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H. y Mann, M. (1996) Proc Natl Acad Sci U S A 93, 14440-14445
- Luchini, A.; Geho, D. H.; Bishop, B.; Tran, D.; Xia, C.; Dufour, R. L.; Jones, C. D.; Espina, V.; Patanarut, A.; Zhou, W.; Ross, M. M.; Tessitore, A.; Petricoin, E. F.; Liotta, L. A. Smart hydrogel particles: Biomarker harvesting: One-step affinity purification, size exclusion, and protection against degradation. Nano Lett. 2008, 8 (1), 350-361

Listado de secuencias

- <110> Novelli, Francesco Natimab Therapeutics S.r.l.
- <120> Un péptido monofosforilado aislado derivado de alfa-enolasa humana útil para diagnóstico y tratamiento del adenocarcinoma pancreático, anticuerpos dirigidos contra dicho péptido monofosforilado y usos del mismo
- <130> Nuestra Ref.: PC1006EC
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1

<211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido aislado derivado de la alfa-enolasa humana
 10 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (8) .. (8)
 <223> FOSFORILACIÓN
 <400> 1
 20 **Arg Ile Glu Glu Glu Leu Gly Ser Lys Ala Lys Phe**
 1 5 10
 <210> 2
 25 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 2
Met Ser Ile Leu Lys Ile His Ala Arg Glu Ile Phe Asp Ser Arg Gly
 1 5 10 15
Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Phe Thr Ser Lys Gly Leu Phe Arg
 20 25 30
Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ile Tyr Glu Ala Leu Glu
 35 40 45
Leu Arg Asp Asn Asp Lys Thr Arg Tyr Met Gly Lys Gly Val Ser Lys
 50 55 60
Ala Val Glu His Ile Asn Lys Thr Ile Ala Pro Ala Leu Val Ser Lys
 65 70 75 80

ES 2 448 804 T3

Lys Leu Asn Val Thr Glu Gln Glu Lys Ile Asp Lys Leu Met Ile Glu
85 90 95

Met Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu
100 105 110

Gly Val Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly Ala Val Glu Lys Gly Val
115 120 125

Pro Leu Tyr Arg His Ile Ala Asp Leu Ala Gly Asn Ser Glu Val Ile
130 135 140

Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly Ser His Ala Gly
145 150 155 160

Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro Val Gly Ala Ala
165 170 175

Asn Phe Arg Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val Tyr His Asn Leu
180 185 190

Lys Asn Val Ile Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asn Val Gly
195 200 205

Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Lys Glu Gly Leu
210 215 220

Glu Leu Leu Lys Thr Ala Ile Gly Lys Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Val
225 230 235 240

Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Phe Arg Ser Gly Lys
245 250 255

Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Pro Ser Arg Tyr Ile Ser
260 265 270

Pro Asp Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Ile Lys Asp Tyr Pro
275 280 285

Val Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly Ala Trp
290 295 300

Gln Lys Phe Thr Ala Ser Ala Gly Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu
305 310 315 320

Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg Ile Ala Lys Ala Val Asn Glu Lys Ser
325 330 335

Cys Asn Cys Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu

ES 2 448 804 T3

340

345

350

Ser Leu Gln Ala Cys Lys Leu Ala Gln Ala Asn Gly Trp Gly Val Met
 355 360 365

Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Thr Phe Ile Ala Asp Leu
 370 375 380

Val Val Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg
 385 390 395 400

Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Leu Arg Ile Glu Glu Glu
 405 410 415

Leu Gly Ser Lys Ala Lys Phe Ala Gly Arg Asn Phe Arg Asn Pro Leu
 420 425 430

Ala Lys

<210> 3

5 <211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Péptido aislado derivado de la alfa-enolasa humana

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9) .. (9)

20

<223> FOSFORILACIÓN

<400> 3

25

Cys Arg Ile Glu Glu Glu Leu Gly Ser Lys Ala Lys Phe
 1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido monofosforilado aislado de una longitud de 12 a 20 aminoácidos, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 1 y caracterizado porque contiene una sola fosforilación en el residuo de serina (S) en la posición 8 de la SEC ID N.º: 1.
2. El péptido monofosforilado aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un residuo de cisteína adicional en la posición amino-terminal o carboxi-terminal.
- 10 3. El polipéptido monofosforilado aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en la SEC ID N.º: 1.
4. El péptido monofosforilado aislado de acuerdo con la reivindicación 2, que consiste en la SEC ID N.º: 3.
- 15 5. El péptido monofosforilado aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que está conjugado con un vehículo.
- 20 6. El péptido monofosforilado aislado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el vehículo se selecciona del grupo que consiste en ovoalbúmina de pollo (OVA), seroalbúmina bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana, proteína de unión a la maltosa de *E. coli*, poliarginina, polihistidina, glutatión-S-transferasa.
7. Un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a un péptido monofosforilado aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, que es un anticuerpo monoclonal.
9. Un kit para el diagnóstico del adenocarcinoma ductal pancreático que comprende, como el reactivo diagnóstico específico, una molécula proteica relacionada específicamente con el adenocarcinoma ductal pancreático seleccionada del grupo que consiste en el péptido monofosforilado aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
- 30 10. Un método de inmunoensayo para el diagnóstico *in vitro* del adenocarcinoma ductal pancreático, que comprende las etapas de:
- 35 a) poner en contacto una muestra biológica de un paciente del que se sospecha que está afectado por adenocarcinoma ductal pancreático con un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
- b) detectar si se produce una unión inmunológica específica entre dicho péptido y autoanticuerpos posiblemente presentes en la muestra biológica del paciente;
- 40 siendo la aparición de dicha unión inmunológica específica indicativa de adenocarcinoma ductal pancreático.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la muestra biológica es suero o sangre.
- 45 12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que es un método de ensayo inmunoenzimático o radioinmunológico.
- 50 13. Una composición farmacéutica para el tratamiento terapéutico del adenocarcinoma ductal pancreático, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 y vehículos, excipientes y/o diluyentes opcionales farmacéuticamente aceptables.
14. El uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 para preparar un medicamento para el tratamiento terapéutico del adenocarcinoma ductal pancreático.