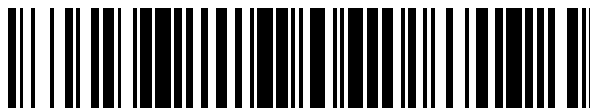


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 859**

21 Número de solicitud: 202330032

51 Int. Cl.:

**C07K 9/00** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**19.01.2023**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.09.2024**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN RIOJA SALUD (33.3%)  
CALLE PIQUERAS 98  
26006 LOGROÑO (La Rioja) ES;  
UNIVERSIDAD DE LA RIOJA (33.3%) y  
UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI VERONA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MARTINEZ RAMIREZ, Alfredo;  
MARTIN CARNICERO, Alfonso;  
MARTINEZ MORAL, Pilar;  
CORZANA LOPEZ, Francisco;  
ASIN VICENTE, Alicia;  
FIAMMENGO, Roberto;  
EGUSKIZA BILBAO, Ander;  
MALERBA, Giovanni y  
DE TOMI, Elisa**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

54 Título: **Glicopéptidos sintéticos y compuestos derivados para la detección de biomarcadores de cáncer en tumores positivos para MUC1 en etapa temprana**

57 Resumen:

Se ha demostrado que la mucina MUC1 se encuentra glicosilada de forma aberrante en una variedad de tumores. La forma asociada a tumores (TA) de MUC1 es inmunogénica y los pacientes generalmente muestran la presencia de autoanticuerpos frente a ella, por tanto, estos anticuerpos constituyen un biomarcador potencial para la detección del cáncer. Hemos desarrollado un epítipo no natural de MUC1, basado en estructura, que puede usarse como un aglutinante muy eficiente de anticuerpos generados por pacientes. Adicionalmente, para mejorar la sensibilidad y la especificidad de un ensayo de cuantificación mediante este aglutinante, hemos generado nanopartículas de oro funcionalizadas con múltiples copias del epítipo no natural. El análisis del suero de pacientes con cáncer de páncreas (n=20) y voluntarios sanos de la misma edad y sexo (n=20), mediante el uso de nanopartículas funcionalizadas en un formato de dot blot, mostró niveles significativamente más altos de autoanticuerpos en los pacientes (p<0,0001). Cuando se compara con los biomarcadores actuales que se usan en la clínica para el cáncer de páncreas (CEA y CA19-9), nuestro sistema presenta más alta sensibilidad y especificidad, con un área bajo la curva (AUC) de 0,918. Por lo tanto, este sistema puede usarse en medicina clínica para la fabricación de un dispositivo capaz de detectar el cáncer de páncreas temprano y otros cánceres que expresan TA-MUC1, entre la población de riesgo, lo que proporciona, por tanto, la oportunidad de una intervención temprana y un aumento significativo en la supervivencia del paciente.

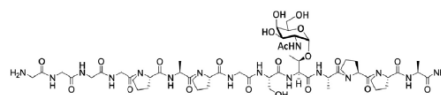


Figura 1A

## DESCRIPCIÓN

Glicopéptidos sintéticos y compuestos derivados para la detección de biomarcadores de cáncer en tumores positivos para MUC1 en etapa temprana

Campo técnico

La presente invención pertenece al campo técnico de la medicina, en particular pertenece al campo técnico de la oncología y, más particularmente, se refiere a glicopéptidos sintéticos adecuados para la detección temprana de tumores pancreáticos y otros tumores que expresan MUC1.

Antecedentes de la invención

MUC1 (mucina-1) es una glicoproteína que carbohidratos complejos unidos mediante un enlace alfa-O-glicosídico a las cadenas laterales de treonina y/o serina. Las mucinas recubren la superficie apical de las células epiteliales en los pulmones, el estómago, los intestinos, los ojos y otros órganos. De esta forma, protegen al cuerpo de infecciones al unirse los patógenos a los oligosacáridos en el dominio extracelular, lo que evita que el patógeno alcance e infecte la célula. La sobreexpresión y la glicosilación anómala de MUC1 se asocian a menudo con cánceres de colon, mama, ovario, pulmón y páncreas, entre otros. Joyce Taylor-Papadimitriou identificó y caracterizó el fragmento más inmunogénico de la glicoproteína MUC1 durante su trabajo con tumores de mama y ovario<sup>1</sup>.

La mucina MUC1 presenta dos subunidades, MUC C-terminal y MUC N-terminal.<sup>2,3</sup> Esta última subunidad se puede desprender de la superficie y, en consecuencia, detectarse en el suero de los pacientes con cáncer.<sup>4,5</sup> La MUC1 glicosilada de forma aberrante, que da lugar a la presentación de carbohidratos sencillos es conocida como (TA)-MUC1 (del Inglés tumor-associated MUC1). En este sentido, la TA-MUC1 se encuentra en niveles muy bajos en el suero humano de personas sanas, que aumentan en los casos de cáncer<sup>6,7</sup>. Por otra parte, para otros biomarcadores, se ha visto que niveles superiores a 40 U/mL de CA 27-29<sup>8</sup> o niveles superiores a 25-30 U/mL de CA 15-3<sup>9</sup> generalmente sugieren la presencia de tumores malignos. Aunque en la bibliografía es posible observar muchos ejemplos de biomarcadores de cáncer basados en antígenos, la mayoría de ellos no exhiben una sensibilidad y especificidad satisfactorias.<sup>5,10-13</sup>

No obstante, los anticuerpos anti-TA-MUC1 generados por el paciente podrían representar una alternativa atractiva ya que, en general, persisten en la sangre por más largo tiempo que los antígenos correspondientes y se encuentran presentes en etapas tempranas de la enfermedad. Cabe destacar que en la bibliografía se han reportado múltiples estudios que usan MUC1 como herramienta para detectar y medir estos anticuerpos. En este contexto, se debe prestar especial atención al sistema desarrollado por Wang y colaboradores. Usaron un péptido que posee 6 unidades de repetición de la MUC1 para la detección de anticuerpos anti-MUC1 en suero humano.<sup>14</sup> En esta línea de investigación, Gheybi y colaboradores desarrollaron una quimera compuesta por MUC1 y un receptor del factor de crecimiento asociado con cáncer de mama (HER2). Esta combinación puede usarse para la detección simultánea de anticuerpos frente a MUC1 y HER2 en suero humano.<sup>15</sup>

Hoy en día, el cáncer de páncreas es el decimocuarto cáncer más común a nivel mundial y la octava causa principal de muerte relacionada con el cáncer.<sup>16</sup> En España, el tumor de páncreas fue la tercera causa principal de muerte provocada por cáncer en 2019.<sup>17</sup> La letalidad de esta enfermedad es una consecuencia de la detección tardía de este tumor, que generalmente se encuentra en una etapa muy avanzada.<sup>18</sup> Actualmente, la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia son las terapias más usadas para tratar el cáncer de páncreas, aunque la expectativa de vida de los pacientes diagnosticados con este cáncer es solo de 4 a 6 meses.<sup>19</sup>

Cabe destacar que, en el cáncer de páncreas, la sobreexpresión de TA-MUC1 se correlaciona con más metástasis y peor pronóstico.<sup>20</sup> Con respecto a esto, los anticuerpos anti-MUC1 podrían desempeñar un papel fundamental en el diagnóstico de pacientes con cáncer de páncreas en las primeras etapas de la enfermedad.<sup>21</sup> La mayoría de los ejemplos que se encuentran en la bibliografía basados en la detección de anticuerpos anti-MUC1 no exhiben ninguna alteración de los antígenos naturales.

Para el manejo clínico de pacientes con cáncer de páncreas, actualmente se emplean dos biomarcadores sanguíneos: CA19-9<sup>22</sup> y el antígeno carcinoembrionario (CEA).<sup>23</sup> Estos biomarcadores, sin embargo, carecen de sensibilidad y especificidad suficiente, por lo que no se pueden usar como marcadores de diagnóstico, si bien actualmente se emplean en el seguimiento de determinados pacientes. Por lo tanto, encontrar biomarcadores más sensibles y específicos puede proporcionar un medio para detectar el cáncer de páncreas en etapa temprana, lo que proporciona, por tanto, la oportunidad de una intervención temprana y un aumento significativo en la supervivencia del paciente.

En resumen, la forma asociada a tumores de MUC1 (TA-MUC1) provoca la producción de anticuerpos en los pacientes. Estos autoanticuerpos pueden constituir un biomarcador atractivo para la detección temprana de la enfermedad y se podrían cuantificar mediante el uso de diferentes sistemas de inmunoensayo. Todos los sistemas que se han reportado hasta ahora carecen de potencial diagnóstico debido a su baja sensibilidad y especificidad. Proponemos el uso de antígenos constituidos por glicopéptidos artificiales cortos unidos a nanopartículas como un

sistema de detección más eficiente de autoanticuerpos específicos de pacientes que se pueden usar para el diagnóstico clínico temprano en pacientes.

#### Descripción resumida de la invención

Con el fin de resolver los inconvenientes del estado de la técnica, realizar modificaciones en la estructura del antígeno podría ser un punto clave para potenciar la interacción entre el antígeno y los anticuerpos TA-MUC1 generados por el paciente y, por lo tanto, mejorar la selectividad y la sensibilidad de un posible sistema de detección.<sup>24,25</sup> Para este propósito, sería esencial conocer las interacciones moleculares por las que estos anticuerpos reconocen a sus dianas.

En este sentido, nuestro grupo de investigación ha obtenido la estructura de rayos X de un glicopéptido de MUC1 formando un complejo con el anticuerpo monoclonal 5E5 (anti-MUC1), lo que proporciona información importante sobre cómo este anticuerpo interactúa con el antígeno y, por tanto, allanando el camino para el diseño de antígenos no naturales con características mejoradas para el reconocimiento antígeno-anticuerpo.<sup>26</sup>

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporcionan glicopéptidos sintéticos no naturales, como se representa por [GGGGPAPGST(GalNCOEt)APPA] o [CGGGPAPGST(GalNCOEt)APPA] y sus glicopéptidos derivados para su uso como antígenos en un sistema de detección para el anticuerpo TA-MUC1 como un biomarcador de cáncer.

Por derivados se debe entender otras moléculas que contienen cualquier pequeña modificación química de estas secuencias de glicopéptidos y que presenten una afinidad más alta que el glicopéptido natural por los anticuerpos diana anti-TA-MUC1.

Estos glicopéptidos se diseñaron para ser más eficaces para la detección del subconjunto apropiado de anticuerpos TA-MUC1 que se correlacionan con el estado de la enfermedad, y nuestros datos demuestran que son útiles como reactivos de diagnóstico para la detección del cáncer de páncreas y, probablemente, para otros cánceres donde MUC1 se encuentra glicosilada de forma aberrante.

El antígeno constituido por un glicopéptido no natural sintético, o compuesto [GGGGPAPGST(GalNCOEt)APPA], tiene 6,5 veces más afinidad por los anticuerpos anti-MUC1 que el antígeno natural. Esto hace de este antígeno (y de sus derivados) una herramienta muy útil para la detección de aquellos cánceres donde MUC1 se encuentra glicosilada de forma aberrante.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un sistema de detección que comprende una nanopartícula y un antígeno constituido por un glicopéptido no natural sintético unido covalentemente, como se representa por [CGGGPAPGST(GalNCOEt)APPA] y sus glicopeptídicos derivados mediante pequeñas modificaciones químicas.

Aunque los ensayos ELISA se usan ampliamente y ofrecen buena selectividad, algunos problemas limitan su aplicación, tales como bajas concentraciones de la muestra o la dificultad para realizar la medición de forma reproducible. En este contexto, y gracias a la nanotecnología, se ha demostrado que algunos nanomateriales convenientemente funcionalizados son muy efectivos en la detección de diferentes marcadores tumorales, dando lugar a pruebas con gran sensibilidad y selectividad.<sup>27,28</sup>

El conjunto de nanopartículas de oro unidas al antígeno [CGGGPAPGST(GalNCOEt)APPA] ayuda en la presentación de antígenos y podría aumentar la sensibilidad del sistema de detección de anticuerpos. Esto se podría extrapolar a cualquier otra combinación de una nanopartícula, tal como micelas, dendrímeros, liposomas, nanopartículas poliméricas híbridas y compactas, fullerenos, carbon dots, puntos cuánticos, sílice, nanopartículas metálicas, entre otras, más un glicopéptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Preferentemente, la nanopartícula es una nanopartícula de oro.

Preferentemente, el antígeno glicopeptídico sintético es [CGGGPAPGST(GalNCOEt)APPA].

El análisis de muestras clínicas ha demostrado que el uso de nuestro glicopéptido no natural unido a nanopartículas de oro (AuNPs) proporciona más alta sensibilidad y especificidad (AUC=0,918) que los biomarcadores sanguíneos CEA y CA19-9 que se usan actualmente, lo que indica, por tanto, que nuestro sistema tiene una ventaja competitiva en el campo de la detección temprana del cáncer de páncreas y, probablemente, otros cánceres donde MUC1 se encuentra glicosilada de forma aberrante.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un kit para realizar un ensayo para detectar y cuantificar la unión entre los anticuerpos anti-MUC1 producidos por el paciente (el biomarcador) de una muestra y uno de los sistemas de detección del primero o el segundo aspecto de la invención, comprendiendo el kit un sistema de detección de acuerdo con el primer o el segundo aspecto de la invención.

El ensayo se puede seleccionar del grupo de dot blot, Western blot, ELISA, SPR, fase líquida, infrarrojo o cualquier otro ensayo adecuado para detectar interacciones antígeno-anticuerpo conocidas en la técnica o desarrolladas en el futuro.

#### Breve descripción de las figuras

La presente invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes párrafos de esta memoria descriptiva, solo a modo de ejemplo, sin pretender constituir ninguna limitación del alcance de la presente invención. La siguiente descripción se puede entender mejor cuando se lee junto con los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra las fórmulas químicas de los antígenos de MUC1, primero el glicopéptido 21 natural (Figura 1A); y después dos glicopéptidos sintéticos (mostrados en las Figuras 1B (glicopéptido 24) y 1C (glicopéptido 33) de acuerdo con una modalidad de la presente invención.

Las Figuras 2A y 2B muestran las curvas de respuesta-concentración que se obtuvieron para la unión de los glicopéptidos 21 y 24, respectivamente, hacia el anticuerpo 5E5 (anti-MUC1) a 20 °C.

La Figura 3 muestra esquemáticamente la ruta sintética para la preparación del complejo glicopéptido-AuNP: (i) pasivación de AuNP con alquil-PEG600 tioles, (ii) acoplamiento de SM(PEG)<sub>2</sub>, (iii) acoplamiento de los glicopéptidos.

La Figura 4 muestra las constantes de disociación ( $K_D$ ) derivadas de experimentos para los conjugados glicopéptido-AuNP estudiados.

La Figura 5 muestra un gráfico que representa los niveles de anticuerpos anti-MUC1 en voluntarios sanos (control) y en pacientes con cáncer de páncreas. Los diagramas de caja representan el intervalo intercuartílico con la mediana como una línea horizontal. \*\*\*\*:  $p < 0,0001$

La Figura 6 muestra un gráfico de la curva característica operativa del receptor (ROC) que representa la sensibilidad y la especificidad de los valores de anticuerpos anti-MUC1 en el suero de los sujetos de estudio, con un área bajo la curva (AUC) de 0,918 (95 % de IC: 0,832-1,000), demostrando 85 % de sensibilidad y 90 % especificidad, con un umbral de discriminación en 11,63 unidades de fluorescencia arbitrarias (AFU). Los valores publicados para CEA y CA19-9 también se representan para la comparación. Ver también la Tabla 4.

#### Descripción detallada de la invención

##### 1) Síntesis de glicopéptidos

Los glicopéptidos se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida asistida por microondas (MW-SPPS) paso a paso en un sintetizador Liberty Blue (CEM®) mediante el uso de la estrategia Fmoc en resina Rink Amide MBHA (0,1 mmol). Los aminoácidos no naturales se sintetizaron siguiendo una ligera modificación del protocolo que se describe en la bibliografía.<sup>29</sup> Los grupos O-acetilo del resto GalNAc se eliminaron en una mezcla de  $\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{MeOH}$  (7:3). Los glicopéptidos se liberaron entonces de la resina y todos los grupos protectores sensibles a los ácidos se eliminaron simultáneamente mediante el uso de TFA al 95 %, TIS (triisopropilsilano) al 2,5 % y  $\text{H}_2\text{O}$  al 2,5 %, seguido de precipitación con éter dietílico frío. Los productos se purificaron por HPLC en una columna Phenomenex Luna C18(2) (10  $\mu\text{m}$ , 250 mm×21,2 mm) y un detector de absorbancia dual, con un régimen de flujo de 20 mL/min.

Siguiendo esta metodología con los aminoácidos adecuadamente protegidos, varios glicopéptidos se sintetizaron y purificaron por HPLC semipreparativa. Incluyen la secuencia natural (glicopéptido 21 mostrado en la Figura 1A), un glicopéptido modificado (24) (mostrado en la Figura 1B), y el mismo glicopéptido con una cisteína añadida para la unión a las nanopartículas (glicopéptido 33) (mostrado en la Figura 1C).

Estas son las características específicas de estos glicopéptidos:

Glicopéptido **21** (GGGGPAPGST(GalNAc)APPA):

Siguiendo la metodología MW-SPPS con los aminoácidos adecuadamente protegidos, se obtuvo el glicopéptido 21 y se purificó por HPLC semipreparativa.

HPLC semipreparativa:  $R_t=12,7$  min (Phenomenex Luna C18 (2), 10  $\mu\text{m}$ , 21,2×250 mm, Grad: acetonitrilo/agua+TFA al 0,1 % (5:95) → (12,5:87,5), 15 min, 20 mL/min,  $\lambda=212\text{nm}$ ).

HPLC analítica:  $R_t=15,8$  min (Phenomenex Luna C18 (2), 5  $\mu\text{m}$ , 4,6×250 mm, Grad: acetonitrilo/agua+TFA al 0,1 % (5:95) → (15:85), 20 min, 1 mL/min,  $\lambda=212\text{nm}$ ).

HRMS (ESI) m/z:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  Calculado para  $\text{C}_{54}\text{H}_{87}\text{N}_{16}\text{O}_{21}$ : 1295,6226; encontrado 1295,6184.

Glicopéptido **24** (GGGGPAPGST(GalNCOEt)APPA):

5 Siguiendo la metodología MW-SPPS con los aminoácidos adecuadamente protegidos, se obtuvo el glicopéptido 24 y se purificó por HPLC semipreparativa.

HPLC semipreparativa: Rt=14,9 min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 µm, 21,2×250 mm, Grad: acetonitrilo/agua+TFA al 0,1 % (5:95) → (12,5:87,5), 15 min, 20 mL/min, λ= 212nm).

10 HPLC analítica: Rt=15,8 min (Phenomenex Luna C18 (2), 5 µm, 4,6×250 mm, Grad: acetonitrilo/agua+TFA al 0,1 % (5:95) → (20:80), 30 min, 1 mL/min, λ= 212nm).

HRMS (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Calculado para C<sub>55</sub>H<sub>89</sub>N<sub>16</sub>O<sub>21</sub>: 1309,6383; encontrado 1309,6327.

15 Glicopéptido **33** (CGGGGPAPGST(GalNCOEt)APPA):

HPLC semipreparativa: Rt=19,1 min (Phenomenex Luna C18 (2), 10 µm, 21,2×250 mm, Grad: acetonitrilo/agua+TFA al 0,1 % (5:95) → (16:84), 22 min, 20 mL/min, λ= 212nm).

20 HPLC analítica: Rt=15,8 min (Phenomenex Luna C18 (2), 5 µm, 4,6×250 mm, Grad: acetonitrilo/agua+TFA al 0,1 % (5:95) → (20:80), 30 min, 1 mL/min, λ= 212nm).

HRMS (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Calculado para C<sub>60</sub>H<sub>96</sub>N<sub>17</sub>O<sub>23</sub>S: 1454,6580; encontrado 1454,6514.

25 2) Estudios de unión antígeno-anticuerpo por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

Los experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizaron con un aparato Biacore X-100 (Biacore, GE) en una disolución tampón HBS-EP a pH 7,5 (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, con DMSO al 2 % y Tween X100 al 0,05 %) a 25 °C. Este es el tampón de ejecución. El anticuerpo 5E5 (de Abcam) se inmovilizó en un chip sensor CM5 (Biacore, GE) siguiendo el método estándar de acoplamiento de amina.<sup>30</sup> Brevemente, la superficie de carboximetil dextrano de la celda de flujo 2 se activó con una inyección de 7 min de una relación 1:1 de una disolución acuosa 0,4 M de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y 0,1 M de sulfo-*N*-hidroxisuccinimida. Entonces, el anticuerpo se unió a la superficie mediante el uso de varias diluciones en acetato de sodio 10 mM, pH 4,0. durante una inyección de 7 min. Los ésteres activos que no reaccionaron en la superficie se inactivaron mediante una inyección de 0,1 M etanolamina-HCl en agua (pH 8,0) de 7 min. Los niveles de inmovilización se encontraron alrededor de las 5500 unidades de resonancia (RU). Se usó como referencia la celda de flujo 1 que se trató como una celda de flujo 2 (procedimiento de acoplamiento de amina) sin proteína. Antes del uso, se diluyeron soluciones madre de 50 mM de ligando peptídico hasta la concentración final en el tampón de ejecución. Así, se inyectaron una serie de compuestos diferentes en el chip sensor con un régimen de flujo de 30 µL/min por un período de 1 min seguido de un período de disociación de 1 min. No se necesitó regeneración. Las Figuras 2A y 2B muestran las curvas de respuesta-concentración que se obtuvieron para la unión del glicopéptido **21** y **24**, respectivamente, hacia el anticuerpo 5E5 (anti-MUC1) a 20 °C en los experimentos de SPR.

45 Los datos del sensograma se obtuvieron por duplicado y se trataron con el programa informático Bia Evaluation X100 (Biacore, GE). Los datos experimentales de las mediciones de afinidad se ajustaron a un modelo específico de dos sitios de unión mediante el uso del programa informático Prism. Las constantes de disociación (K<sub>D</sub>) resultantes son mostradas en la Tabla 1.

50 Tabla 1. Parámetros termodinámicos de unión que se obtuvieron por SPR para 5E5 con varios glicopéptidos a 20 °C y pH 7,5.

| Compuesto | Péptido                  | K <sub>D</sub> (µM) | R <sub>máx</sub> (RU) | Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> ) |
|-----------|--------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| <b>21</b> | GGGGPAPGST(GalNAc)APPA   | 0,54                | 23                    | 0,5                                 |
| <b>24</b> | GGGGPAPGST(GalNCOEt)APPA | 0,083               | 23                    | 0,04                                |

Por lo tanto, el glicopéptido no natural (**24**) tiene una afinidad 6,5 veces más alta (= menor disociación) que el péptido natural (**21**).

### 3) Síntesis de nanopartículas y conjugación del péptido

Todo el material de vidrio que se empleó para la preparación de nanopartículas se limpió con agua regia (HCl (37%)/HNO<sub>3</sub> (65 %) 3:1). Se usó agua desionizada ultrapura (sistema de purificación de agua Millipore Elix® 35, 18,2 MΩ cm) para la preparación de todas las disoluciones acuosas. Todas las disoluciones que se usaron para la preparación de nanopartículas se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,2 μm (acetato de celulosa, Whatman®). Las nanopartículas de oro (AuNP) se caracterizaron por dispersión dinámica de luz (DLS) (Zetasizer, Malvern Instruments o Litesizer500, Anton Paar). El diámetro medio de las AuNP se midió mediante TEM (microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 que opera a un voltaje de aceleración de 100 kV). Las mediciones de UV/Vis se llevaron a cabo mediante el uso de un lector de placas TECAN Infinite M200 Pro. La concentración de oro se determinó mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (Agilent 720 ICP-OES) o espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (iCAP™ RQ ICP-MS -Thermo Scientific).

Las AuNP recubiertas con citrato, con un diámetro de 13,0±1,0 nm, se sintetizaron de acuerdo con un procedimiento publicado.<sup>31</sup> Las AuNP se pasivaron mediante la formación de monocapas autoensambladas de alquil-PEG600 tioles en su superficie.<sup>32</sup> Se usó una mezcla de tioles PEG600 terminados en carboxi y amino (I y II) siendo la fracción molar del derivado terminado en amino  $\chi_{\text{NH}_2}$  =0,06. Las disoluciones stock de tioles en EtOH (5 mM) se prepararon inmediatamente antes de su uso y se utilizaron directamente.

Las concentraciones finales en la reacción de pasivación fueron: AuNP 80-90 nM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, tioles 1 mM (total) y por lo tanto la reacción contenía EtOH al 20 % v/v. Se continuó la agitación a ta (temperatura ambiente) por 96 h después de las cuales las PEG-AuNP se purificaron por ultrafiltración en filtros Amicon Ultra-15 (1×15 mL de NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, 1×15 mL de EtOH/NaHCO<sub>3</sub> 50 mM 2:8 v/v y 2×15 mL de disolución tampón NaHCO<sub>3</sub> 50 mM). Las PEG-AuNP purificadas se dispersaron en H<sub>2</sub>O a una concentración final entre 200 y 400 nM.

Los péptidos que se describen anteriormente se acoplaron a las PEG-AuNP de acuerdo con un procedimiento que se reportó anteriormente.<sup>33</sup> De forma breve, se añadió el derivado SM(PEG)<sub>2</sub> en una concentración final de 5 mM a una muestra de AuNP funcionalizadas con grupos amino en una disolución tampón fosfato 30 mM a pH 8,2. La concentración de AuNP en la mezcla de reacción puede ser tan alta como 400 nM. La mezcla de reacción se agitó 4 h a 1 °C. Las AuNP así funcionalizadas se purificaron mediante ultrafiltración (2×4 mL de EtOH/tampón fosfato 20 mM a pH 8,2 2:8 y 2×4 mL de H<sub>2</sub>O) al realizar todas las etapas en hielo, en una centrifuga que se enfría a 4 °C, y con disoluciones de lavado frías. Las partículas AuNP funcionalizadas y purificadas se dispersaron en agua. En paralelo, se incubaron 200 μL de una disolución 1 mM en agua del péptido con clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 10 mM durante 2 h a 0 °C para reducir completamente la formación de disulfuros derivados de los glicopéptidos.

Para la reacción de acoplamiento, se añadió la cantidad necesaria de péptido recién tratado con TCEP a una solución fría recién preparada de AuNP funcionalizadas y se agitó durante toda la noche a 4 °C, a 500 rpm. El volumen de reacción típico fue de 500 μL y las concentraciones finales en la mezcla de reacción fueron: AuNP funcionalizadas ~100 nM, tampón fosfato 15 mM a pH 7,0, 50 μM de péptido. El exceso de péptido no acoplado se eliminó por centrifugación, eliminación del sobrenadante, y resuspensión en 1 mL de tampón (tres ciclos, 20800 ×g, 45 min, 18 °C), resuspensión por primera vez en 1 mL de NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, entonces dos veces en NaHCO<sub>3</sub> 10 mM. Finalmente, las AuNP acopladas a péptidos purificados se trataron con 350 μL de NaHCO<sub>3</sub> 10 mM para alcanzar una concentración final de alrededor de 100 nM, la que se almacenó protegida de la luz a +4 °C. El procedimiento se representa esquemáticamente en la Figura 3.

El radio hidrodinámico de las AuNP se determinó por DLS. Las AuNP se suspendieron en NaHCO<sub>3</sub> 10 mM. Los potenciales ζ se midieron en el mismo tampón. Los valores se reportan en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de las AuNP que se usan en este trabajo.

|                             | DLS <sup>a</sup>   |       | Potencial ζ <sup>a</sup> |
|-----------------------------|--------------------|-------|--------------------------|
|                             | Ø(nm) <sup>b</sup> | PDI   | (mV)                     |
| AuNP                        |                    |       |                          |
| AuNP-glicopéptido <b>33</b> | 28±1               | 0,127 | -33±4                    |

<sup>a</sup> Mediciones en NaHCO<sub>3</sub> 10 mM. <sup>b</sup> Derivado de distribuciones de intensidad.

## 5 4) Ensayo de dot blot

Las AuNP se colocaron por triplicado con un capilar sobre membranas de nitrocelulosa previamente humedecidas (AuNP, 16 nM) y se dejaron secar a temperatura ambiente (ta) por al menos 2 h.

10 Para los ensayos de afinidad (resultados mostrados en la Figura 4), cada membrana se bloqueó con leche desnatada al 5 % en solución salina tamponada con tris (TBS) durante 1 h, se lavó en TBS con Tween 20 al 0,1 % (3x10 min) y se incubó durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-MUC1 5E5 proporcionado por el Dr. Clausen (Universidad de Copenhague) (1 µg/mL a 0,000122 µg/mL en leche al 5 % en TBS). Después de lavarse con TBS que contiene Tween 20 al 0,1 % (3x10 min), las membranas se incubaron con anticuerpo secundario Dylight 800 anti-IgG de ratón (H+L) obtenido en cabra (039610-145-121, Tebu-bio), diluido 1:2500 en TBS por 1 hora a ta.

15 Finalmente, las membranas se lavaron en TBS con Tween 20 al 0,1 % (3x10 min) y con TBS (2x10 min) y se visualizaron mediante el uso de un Sistema de Imágenes Infrarrojas Odyssey de LI-COR Biosciences. La intensidad de las marcas se cuantificó mediante densitometría con ImageJ, restando el fondo.

20

## 5) Análisis de suero de pacientes con cáncer de páncreas y voluntarios sanos

25 El estudio se diseñó como un estudio clínico retrospectivo, observacional, y longitudinal. Todos los datos fueron anonimizados. Los datos personales y clínicos que se recolectaron para el estudio de acuerdo con la Ley de Protección de Datos Española (Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre de Protección de Datos Personales). El estudio se adhiere a todos los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de revisión local (Comité Ético de Investigación Clínica de La Rioja, Ref. CEICLAR P.I. 260). Se recolectó sangre de todos los sujetos que firmaron el consentimiento informado y se extrajo suero, que se sometió a un ensayo de inmunorreactividad frente al antígeno MUC1 mediante la técnica de dot blot.

30 Participaron en el estudio un grupo de 20 pacientes con cáncer de páncreas (65 % varones, 65,2±9,0 años) y 20 voluntarios sanos emparejados por edad y sexo (65 % varones, 63,4±7,5 años) (Hospital San Pedro, Logroño, España). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos con respecto tanto a la relación de edad como en la de sexo (Tabla 3).

35

Tabla 3. Distribución por edad y sexo de pacientes con cáncer y voluntarios sanos en el estudio. Pruebas estadísticas que se emplearon: Chi cuadrado (\*) o prueba-t (†).

|                   | Voluntarios sanos<br>(n=20) | Pacientes con cáncer<br>(n=20) | valor de p |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------|
| Sexo (hombres, %) | 13 (65 %)                   | 13 (65 %)                      | 1,000*     |
| Edad (años)       | 63,4±7,5 años               | 65,2±9,0                       | 0,507†     |

40 Para el análisis del suero, cada membrana se funcionalizó con nanopartículas como se describe en la sección 4, se bloqueó con BSA al 5 % en TBS por 1 h, se lavó en TBS con Tween 20 al 0,1 % (3x10 min) y se incubó durante toda la noche a 4 °C con suero del paciente (dilución 1:100 en TBS con BSA al 1 %). Después de lavarse con TBS que contiene Tween 20 al 0,1 % (3x10 min), las membranas se incubaron con anticuerpo secundario Dylight 800 anti-IgG humana (H+L) obtenido en conejo (039609-445-002, Tebu-bio), diluido 1:5000 en TBS por 1 h a ta. Finalmente, las membranas se lavaron en TBS con Tween 20 al 0,1 % (3x10 min) y con TBS (2x10 min) y se visualizaron mediante el uso de un Sistema de Imágenes Infrarrojas Odyssey de LI-COR Biosciences. La intensidad de las marcas se cuantificó mediante densitometría con ImageJ, restando el fondo.

45

50 Cada suero se analizó por triplicado, y el ensayo se realizó por triplicado (tres membranas distintas por cada suero). La primera normalización se realizó en los casos y controles por separado mediante el uso de la función entre matrices de la biblioteca Limma (biblioteca principal de R) dentro de cada adquisición. Esto se hizo para evitar la pérdida del efecto de la enfermedad. Después, las intensidades de todas las adquisiciones se normalizaron según la media total

de las adquisiciones. Esto es necesario para eliminar el sesgo de intensidad asociado a las diferentes adquisiciones que se realizan con el escáner fluorescente. Con el fin de realizar un análisis estadístico de los datos, se fusionaron los triplicados de las muestras, promediando las intensidades para cada péptido-AuNP que se probó.

Para el análisis estadístico, se verificó la normalidad de la distribución de datos (prueba de Shapiro-Wilk) y la homocedasticidad (prueba de Levene). Cuando los conjuntos de datos se distribuyeron normalmente con varianzas iguales, se usó la prueba-*t*. Se aplicó la prueba de Welch en caso de datos normales y heterocedasticidad. Se usó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney para los datos no normales. El nivel de significación se estableció en  $p < 0,05$ .

Los niveles de anticuerpos anti-MUC1 encontrados en pacientes con cáncer ( $11,76 \pm 0,14$  unidades arbitrarias de fluorescencia, AFU) fueron estadísticamente significativamente más altos ( $p < 0,0001$ ) que en voluntarios sanos ( $11,38 \pm 0,26$  AFU) (Figura 5).

Para comprender mejor el potencial de nuestro sistema de inmunorreactividad frente a MUC1 como herramienta de diagnóstico, se construyó una curva característica operativa del receptor (ROC). Se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0,918 (IC 95 %: 0,832-1,000). El umbral óptimo se calculó en 11,63 AFU para la suma máxima de sensibilidad (85 %) más especificidad (90 %) (Figura 6).

Al comparar estos valores con los de dos marcadores tumorales actualmente en uso para el seguimiento del cáncer de páncreas, la ventaja de nuestro sistema es bastante clara (Figura 6, Tabla 4).

Tabla 4. Valores de sensibilidad y especificidad de dos marcadores tumorales que se usan actualmente para el seguimiento del cáncer de páncreas y resultados que se obtienen para nuestro ensayo de dot blot utilizando nanopartículas (glicopéptido **33**)

|                           | Sensibilidad | Especificidad | AUC                                   |
|---------------------------|--------------|---------------|---------------------------------------|
| CEA <sup>23</sup>         | 77,0         | 83,2          | aproximadamente 0,8<br>(no publicado) |
| CA19-9 <sup>22</sup>      | 69,5         | 98,2          | 0,875                                 |
| NP-glicopéptido <b>33</b> | 85,0         | 90,0          | 0,918                                 |



## Referencias

- 5 (1) Taylor-Papadimitriou, J.; Burchell, J.; Milles, D.W.; Dalziel, M. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1455:301-313.
- (2) Kufe, D. W. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9 (12), 874–885.
- (3) Levitin, F.; Stern, O.; Weiss, M.; Gil-Henn, C.; Ziv, R.; Prokocimer, Z.; Smorodinsky, N. I.; Rubinstein, D. B.; Wreschner, D. H. *J. Biol. Chem.* 2005, 280 (39), 33374–33386.
- 10 (4) Boshell, M.; Lalani, E.; Pemberton, L.; Burchell, J.; Gendler, S.; Taylor-Papadimitriou, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, 185 (1), 1–8.
- (5) Smorodinsky, N.; Weiss, M.; Hartmann, M.; Baruch, A.; Harness, E.; Yaakovovitz, M.; Keydar, I.; Wreschner, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 228 (1), 115–121.
- (6) Yousefi, M.; Dehghani, S.; Nosrati, R.; Zare, H.; Evazalipour, M.; Mosafer, J.; Tehrani, B. S.; Pasdar, A.; Mokhtarzadeh, A.; Ramezani, M. *Biosens. Bioelectron.* 2019, 130, 1–19.
- 15 (7) Moreno, M.; Bontkes, H. J.; Scheper, R. J.; Kenemans, P.; Verheijen, R. H. M.; von Mensdorff-Pouilly, S. *Cancer Lett.* 2007, 257 (1), 47–55.
- (8) Frenette, P. S.; Thirlwell, M. P.; Trudeau, M.; Thomson, D. M. P.; Joseph, L.; Shuster, J. S. *Tumor Biol.* 1994, 15 (5), 247–254.
- 20 (9) Rughetti, A.; Fama, A.; von Mensdorff-Pouilly, S.; Taurino, F.; Rahimi, H.; Ribersani, M.; Natalino, F.; D'Elia, G. M.; Bizzoni, L.; Latagliata, R.; y otros *Blood* 2008, 112 (11), 5237–5237.
- (10) Tothill, I. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009, 20 (1), 55–62.
- (11) Meyer, T.; Rustin, G. *Br. J. Cancer* 2000, 82 (9), 1535–1538.
- (12) Basil, C.; Zhao, Y.; Zavaglia, K.; Jin, P.; Panelli, M.; Voiculescu, S.; Mandruzzato, S.; Lee, H.; Seliger, B.; Freedman, R.; y otros *Cancer Res.* 2006, 66 (6), 2953–2961.
- 25 (13) Bohunicky, B.; Mousa, S. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2010, 4 (1), 1–10.
- (14) Tang, Y.; Wang, L.; Zhang, P.; Wei, H.; Gao, R.; Liu, X.; Yu, Y.; Wang, L. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17 (12), 1903–1908.
- (15) Gheybi, E.; Amani, J.; Salmanian, A. H.; Mashayekhi, F.; Khodi, S. *Tumor Biol.* 2014, 35 (11), 11489–11497.
- 30 (16) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. *CA. Cancer J. Clin.* 2021, 71 (3), 209–249.
- (17) Spain: number of deaths from cancer by type 2019 | Statista <https://www.statista.com/statistics/777097/number-of-deaths-from-cancer-in-spain-by-type-of-cancer/> (consultado el 3 de noviembre de 2021).
- (18) Bose, M.; Mukherjee, P. *Vaccines* 2020, 8 (4), 1–21.
- 35 (19) Curry, J. M.; Thompson, K. J.; Rao, S. G.; Besmer, D. M.; Murphy, A. M.; Grdzlishvili, V. Z.; Ahrens, W. A.; McKillop, I. H.; Sindram, D.; Iannitti, D. A.; y otros *J. Surg. Oncol.* 2013, 107 (7), 713–722.
- (20) Tinder, T.; Subramani, D.; Basu, G.; Bradley, J.; Schettini, J.; Million, A.; Skaar, T.; Mukherjee, P. *J. Immunol.* 2008, 181 (5), 3116–3125.
- (21) Hamanakai, Y.; Suehiro, Y.; Fukui, M.; Shikichi, K.; Imai, K.; Hinoda, Y. *Int. J. Cancer* 2003, 103 (1), 97–100.
- 40 (22) Murakami, M.; Nagai, Y.; Tenjin, A.; Tanaka, Y. *Endocr. J.* 2018, 65 (6), 639–643.
- (23) Pasanen, P. A.; Eskelinen, M.; Partanen, K.; Pikkariainen, P.; Penttilä, I.; Alhava, E. *Br. J. Cancer* 1993, 67 (4), 852–855.
- (24) Martínez-Sáez, N.; Peregrina, J. M.; Corzana, F. *Chem. Soc. Rev.* 2017, 46 (23), 7154–7175.
- (25) Compañón, I.; Guerreiro, A.; Mangini, V.; Castro-López, J.; Escudero-Casao, M.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Castillo, S.; Asensio, J. L.; Jiménez-Osés, G.; y otros *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141, 4063–4072.
- 45 (26) Macías-León, J.; Bermejo, I. A.; Asín, A.; García-García, A.; Compañón, I.; Jiménez-Moreno, E.; Coelho, H.; Mangini, V.; Albuquerque, I. S.; Marcelo, F.; Asensio, J.L.; Bernardes, G. J.L.; Joshi, H. J.; Fiammengo, R.; Blixt, O.; Hurtado-Guerrero, R.; Corzana, F. *Chem. Commun.* 2020, 56, 15137–15140.
- (27) Y. Zhang, M. Li, X. Gao, Y. Chen, T. Liu, *Journal of Hematology & Oncology* 2019, 12, 137.
- 50 (28) S. Jain, K. Raza, AK Agrawal, A. Vaidya, en *Nanotechnology Applications for Cancer Chemotherapy* (Eds.: S. Jain, K Raza, AK Agrawal, A. Vaidya), Elsevier, 2021, pp. 631-663.
- (29) Bermejo, I.A.; Usabiaga, I.; Compañón, I.; y otros *J. Am. Chem. Soc.* 2018, 140, 9952–9960.
- (30) Johnsson, B.; Löfås, S.; Lindquist, G. *Anal. Biochem.* 1991, 198 (2), 268–277.
- (31) Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J. *Anal. Chem.* 2002, 67 (4), 735–743.
- (32) Maus, L.; Dick, O.; Bading, H.; Spatz, J. P.; Fiammengo, R. *ACS Nano* 2010, 4 (11), 6617–6628.
- 55 (33) Cai, H.; Degliangeli, F.; Palitzsch, B.; Gerlitzki, B.; Kunz, H.; Schmitt, E.; Fiammengo, R.; Westerlind, U. *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24 (5), 1132–1135.

# REIVINDICACIONES

- 5 1. Glicopéptidos sintéticos no naturales, como se representa por [GGGGPAPGST(GaINCOEt)APPA] y/o [CGGGGPAPGST(GaINCOEt)APPA] y/o sus glicopéptidos sintéticos derivados para su uso como detectores de biomarcadores de cáncer en la detección de tumores en etapa temprana.
- 10 2. Una plataforma de unión de biomarcadores que comprende una nanopartícula y un antígeno glicopeptídico no natural sintético unido covalentemente, como se representa por [CGGGGPAPGST(GaINCOEt)APPA] y/o sus antígenos glicopeptídicos derivados para su uso como detectores de biomarcadores de cáncer en la detección de tumores en etapa temprana.
- 15 3. Una plataforma de unión de acuerdo con la reivindicación 2 en donde la nanopartícula comprende una nanopartícula de oro.
4. Una plataforma de unión de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la nanopartícula comprende micelas, dendrímeros, liposomas, nanopartículas poliméricas híbridas y compactas, fullerenos, carbon dots, puntos cuánticos, sílice y nanopartículas metálicas.
- 20 5. Una plataforma de unión de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 4, en donde el glicopéptido sintético no natural es [CGGGGPAPGST(GaINCOEt)APPA].
6. Un kit para realizar un ensayo para detectar y cuantificar la unión entre anticuerpos anti-MUC1 producidos por el paciente de una muestra y una plataforma de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 25 7. Un kit de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el ensayo se selecciona del grupo de dot blot, Western blot, ELISA, SPR y espectroscopía infrarroja en fase líquida.

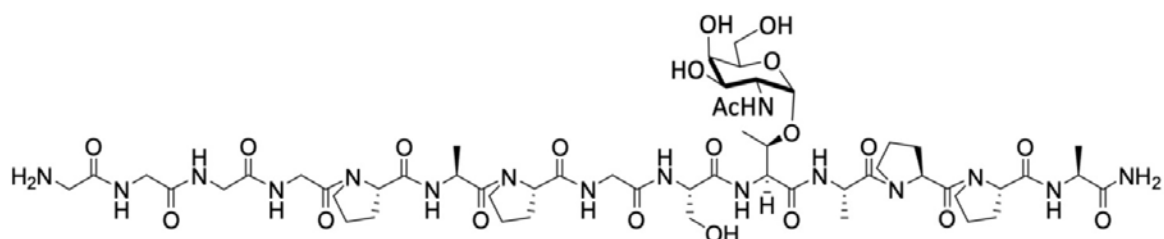


Figura 1A

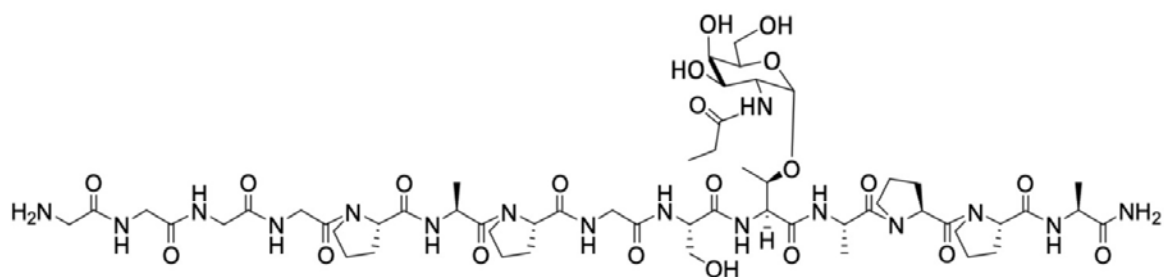


Figura 1B

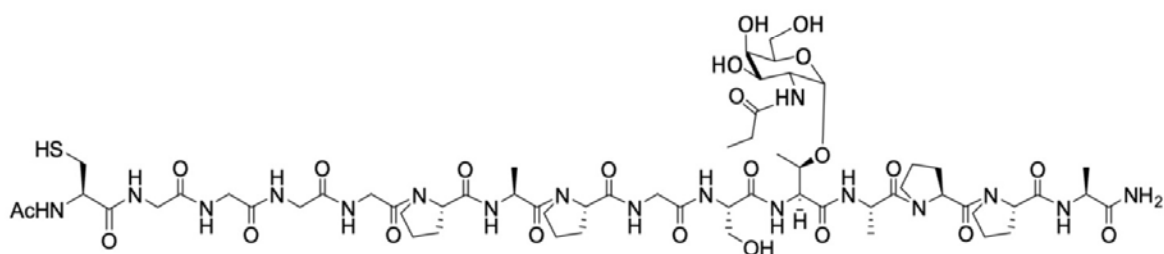


Figura 1C

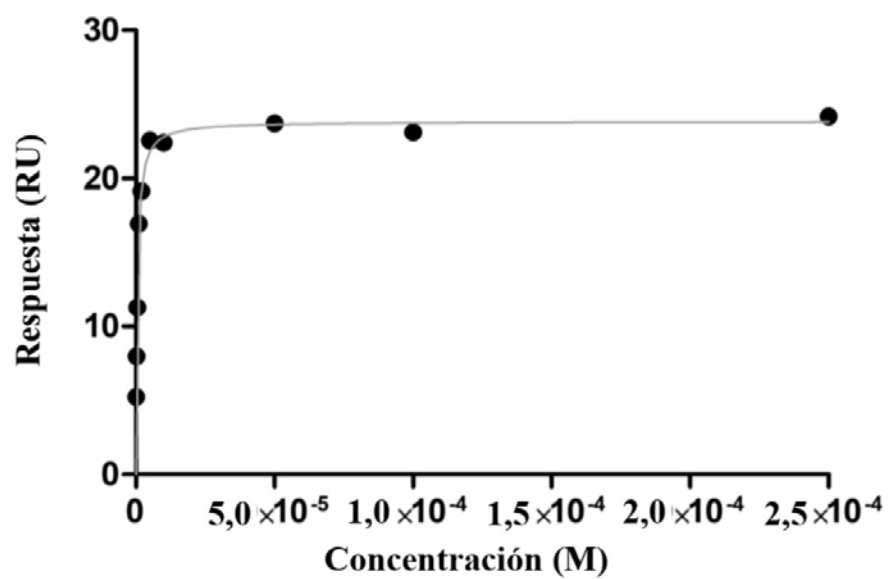


Figura 2A

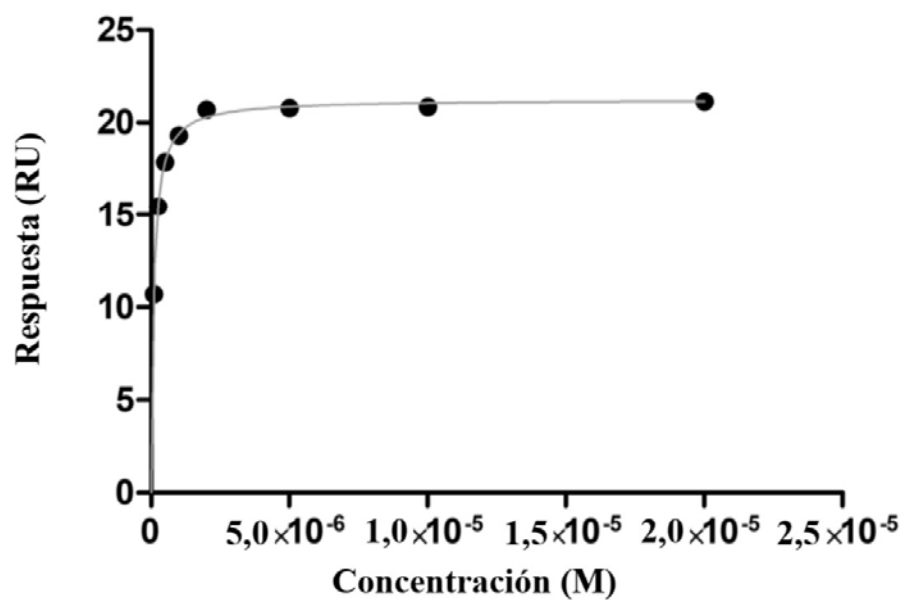


Figura 2B

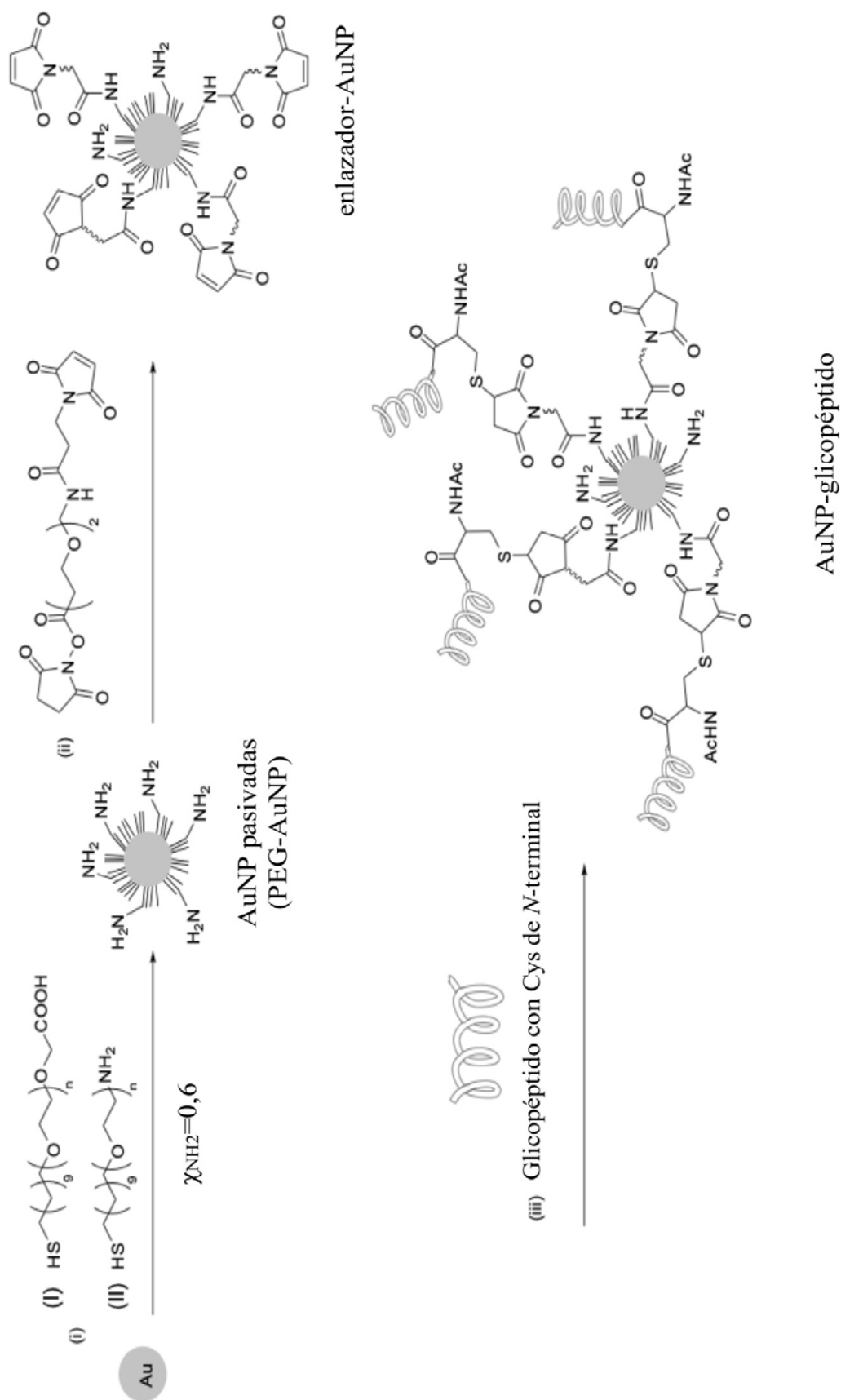


Figura 3

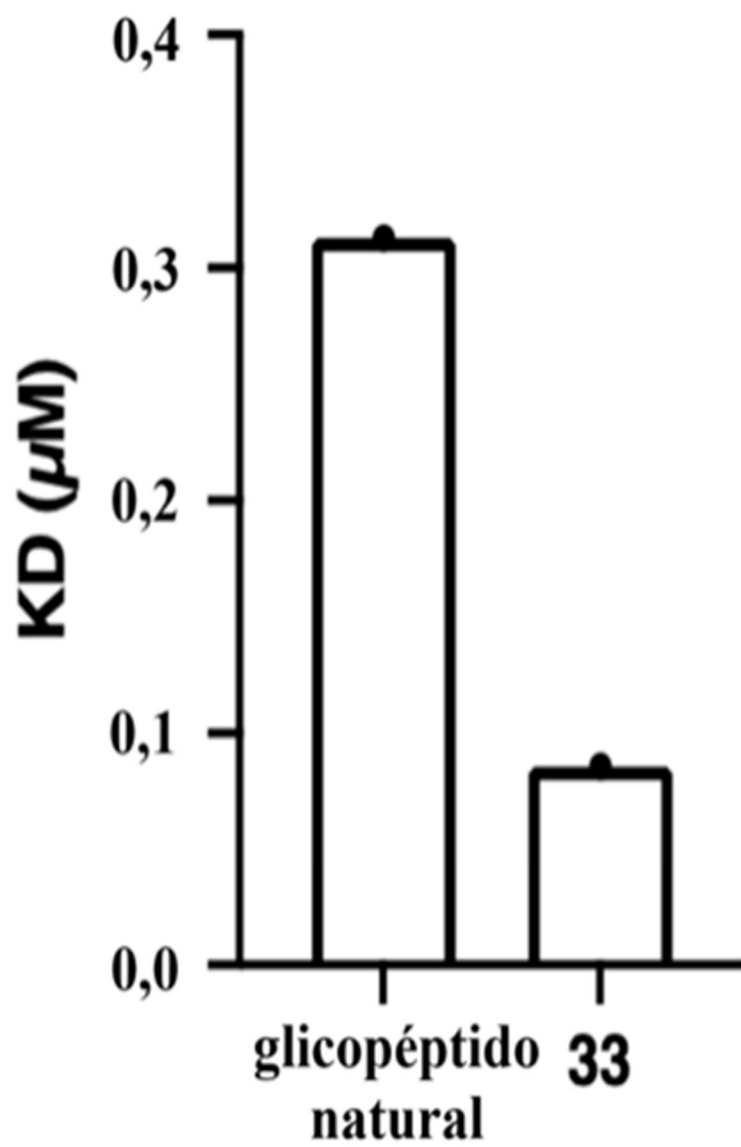


Figura 4

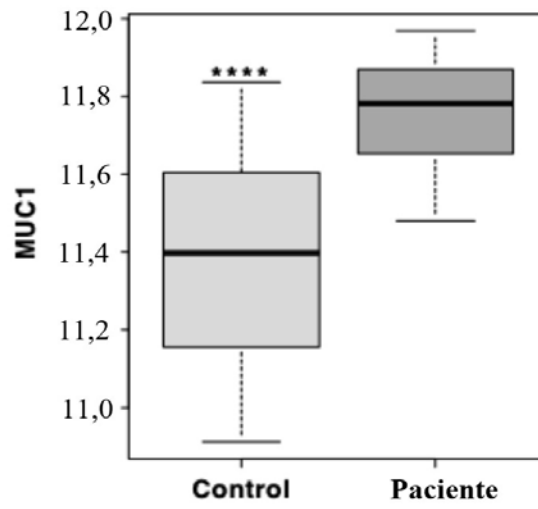


Figura 5

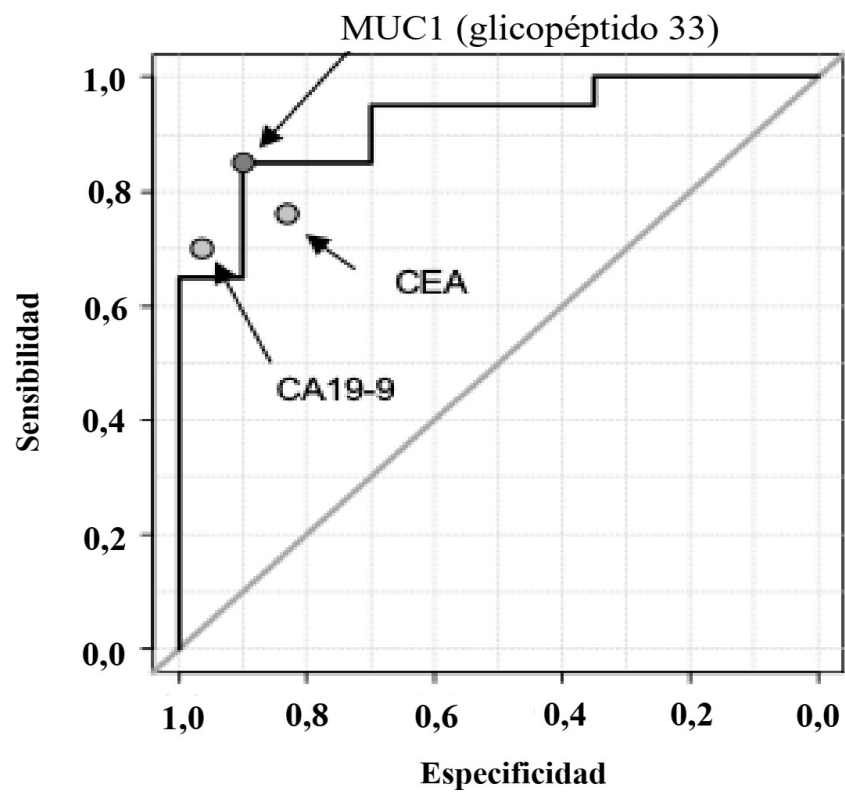


Figura 6



- ②① N.º solicitud: 202330032  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.01.2023  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: **C07K9/00** (2006.01)  
**G01N33/574** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                                                     | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| X         | MACÍAS-LEÓN J. et al. Structural characterization of an unprecedented lectin-like antitumoral anti-MUC1 antibody. Chem. Commun.10/11/2020, Vol. 56, Páginas 15137-15140, todo el documento                                                                                                | 1, 3                       |
| X         | WO 9940881 A2 (BASTERT GUNTHER [DE]; KAUL SEPP [DE]) 19/08/1999, todo el documento                                                                                                                                                                                                        | 1, 3                       |
| X         | US 2017322219 A1 (WANDALL et al) 09/11/2017, todo el documento                                                                                                                                                                                                                            | 1, 3                       |
| A         | TRÉHOUX S. et al. The MUC1 oncomucin regulates pancreatic cancer cell biological properties and chemoresistance. Implication of p42-44 MAPK, Akt, Bcl-2 and MMP13 pathways. Biochemical and Biophysical Research Communications, 13/12/2014, Vol. 456, Páginas 757-762, todo el documento | 1, 3                       |
| A         | HAMANAKA Y. et al. Circulating anti-MUC1 IGG antibodies as a favorable prognostic factor for pancreatic cancer. Int. J. Cancer, 2003, Vol. 103, Páginas 97-100, todo el documento                                                                                                         | 1, 3                       |
| A         | KRAČUN S. K. et al. Random Glycopeptide Bead Libraries for Seromic Biomarker Discovery. J. Proteome Res, 03/12/2010, Vol. 9, Nº 12, Páginas 6705-6714, todo el documento                                                                                                                  | 1, 3                       |
| A         | CAI H. et al. Glycopeptide-functionalized gold nanoparticles for antibody induction against the tumor associated mucin-1 glycoprotein. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 22/01/2016, Vol. 24, Páginas 1132-1135, todo el documento                                                        | 1, 3                       |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 1, 3

Fecha de realización del informe  
13.09.2023

Examinador  
M. Cumbreño Galindo

Página  
1/2



Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, EBI, REGISTRY