



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 396**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02799075 .3**

96 Fecha de presentación : **30.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1465927**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

54 Título: **Anticuerpos BAG3 para su uso en investigación, diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con la muerte celular.**

30 Prioridad: **28.12.2001 EP 01830834**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.05.2011**

73 Titular/es: **BIOUNIVERSA S.R.L.**  
**Vía Ponte Don Melillo**  
**Fisciano, IT**  
**Maria Caterina Turco**

72 Inventor/es: **Leone, Arturo y**  
**Turco, Maria Caterina**

74 Agente: **Álvarez López, Fernando**

**ES 2 359 396 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

Anticuerpos BAG3 para su uso en investigación, diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con la muerte celular

5

**Campo de la invención**

La presente invención proporciona secuencias del nucleótido y la proteína BAG3 para su uso en investigación, diagnóstico y terapia de enfermedades relacionadas con la muerte celular, y para la modulación de la supervivencia y/o muerte celular.

10

Más particularmente la invención se refiere al uso de construcciones basadas en oligonucleótidos no codificantes específicos y anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de péptidos en leucemias, otras neoplasias y enfermedades relacionadas con la muerte celular.

15

**Antecedentes**

La muerte celular por apoptosis es el responsable principal del control de los procesos de homeostasis, de diferenciación e inmunitarios en tejidos. Las alteraciones en el programa de apoptosis están involucradas en daños crónicos y agudos de tejidos (isquemia cardiaca, renal, cerebral o de otros tejidos, trastornos degenerativos crónicos tales como la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y otras, etc.), caracterizadas por una apoptosis excesiva, y enfermedades neoplásicas, autoinmunitarias y de otro tipo que suponen una apoptosis insuficiente. Además, puesto que los compuestos anti-neoplásicos actúan principalmente induciendo la apoptosis en células cancerígenas, las moléculas involucradas en la respuesta apoptótica determinan la sensibilidad o resistencia de la célula neoplásica al tratamiento. Los componentes y/o reguladores bioquímicos de las vías apoptóticas pueden ser dianas para tratamientos de modulación, algunos de los cuales se han mostrado eficaces en modelos preclínicos y ahora se encuentran en ensayos clínicos en humanos. Además, las moléculas involucradas en la apoptosis pueden representar herramientas diagnósticas en un grupo de enfermedades y reactivos para el trabajo de laboratorio (1).

20

BAG3 es un miembro de la familia de proteínas BAG, involucrada en la actividad co-chaperona para el plegamiento intracelular de proteínas (2). Aunque BAG3 presenta homología con los otros miembros de la familia BAG en algunas partes, como el dominio BAG, otras partes de sus secuencias de nucleótidos y proteínas son únicas (2-4). Hemos utilizado estas porciones únicas, específicas de BAG3, para la invención descrita en el presente documento.

A continuación se presentan las secuencias de nucleótidos y péptidos de BAG3; las partes subrayadas corresponden a partes que se consideran particularmente relevantes para la presente invención.

Secuencia de nucleótidos de BAG3 (SEQ ID NO: 1):

Referencia: NCBI PubMed, XM 055575

atanogen 3 asociado a BCL2 de *Homo sapiens* (BAG3), ARNm  
gi|16156810|ref|XM — 055575.1[[16156810]

1 gcggagctcc gcatccaacc ccgggccgcg gccacttt ttggactgga ccagaagttt  
61 ctagccggcc agttgctacc tcccttacc tctcctcc cctctggcag ccaggaggct  
45 121 attccagac actccaccc ctctctggcc acgtcacccc cgccttfaat tcataaagg  
181 gcccggcggc ggcttcccgg acacgtcggc ggcggagagg ggcccacggc ggcggcccgg  
241 ccagagactc ggcgcccggg gccagcggcc cgcacccgcg ccccagcggg cagaccccaa  
50 301 cccagcatga gcgcccac ccactcggcc atgatgcaag tggcgtccgg caacggtgac  
361 cgcgaccctt tgcccccg atgggagatc aagatgacc cgcagaccgg ctggccctt  
421 ttcgtggacc acaacagccg caccactacg tggaacgacc cgcgctgacc ctctgaggc  
55 481 ccaaggaga cccatcctc tgccaatgac ccttcccggg aggcctctag gctgccgct  
541 gctaggggag gccaccctgt gtaccccaag ctccgaccag gctacattcc cattcctgtg  
601 ctccatgaag gcgctgagaa ccggcaggtg cacccttcc atgtctatcc ccagcctggg  
60 661 atgcagcgaat tccgaactga ggcggcagca gcggctcctc agaggtccca gtcacctctg  
721 cggggatgc cagaaaccac tcagccagat aaacagtgtg gacaggtggc agcggcggc

781 gcagcccagc cccagcctc ccacggacct gagcggctcc agtctccagc tgctctgac  
 841 tgctcatcct catctcctc ggccagcctg ccttctccg qcaggagcag cctgggcagt  
 901 caccagctcc cgcgggggta catctccatt ccggtgatac acgagcagaa cgttaccgg  
 961 ccagcagccc agccctcct ccaccaagcc cagaagacgc actaccagc gcagcagggg  
 5 1021 gagtaccaga cccaccagcc tgtgtaccac aagatccagg gggatgactg ggagccccgg  
 1081 cccctgcggg cggcatcccc gttcaggta tctgtccagg gtgcatcgag ccgggagggc  
 1141 tcaccagcca ggagcagcac gccactccac tccccctgc ccatccgtgt gcacaccgtg  
 10 1200 gtcgacaggc ctgacagcc catgacccat cgagaaactg cacctgtttc ccagcctgaa  
 1261 aacaaaccag aaagtaagcc aggccagtt ggaccagaac tcctcctgg acacatccca  
 1321 attcaagtga tccgcaaaga ggtgattct aaacctgtt cccagaagcc cccacctccc  
 15 1381 tctgagaagg tagagtgaa agtccccct gctccagttc cttgtcctc tcccagccct  
 1441 ggccttctg ctgtcccct tcccccaag agtgtggta cagaagagag ggcagcccc  
 1501 agcactgcc ctgcagaagc tacactcca aaaccaggag aagccgagc tccccaaaa  
 20 1561 catccaggag tctgaaagt ggaagccatc ctggagaagg tgcaggggct ggagcaggct  
 1621 gtagacaact tgaaggcaa gaagactgac aaaaagtacc tgatgatcga agagtattg  
 25 1681 accaaagagc tctggccct ggattcagt gaccccgagg gacgagccga tctgctcag  
 1741 gccaggagag acggtgctag gaaggtcag accatctgg aaaaactga acagaaagcc  
 1801 attgatctc caggtcaagt ccaggtctat gaactccagc ccagcaacct tgaagcagat  
 30 1861 cagccactgc aggcaatcat ggagatgggt gccgtggcag cagacaaggg caagaaaaat  
 1921 gctggaaatg cagaagatcc ccacacagaa acccagcagc cagaagccac agcagcagcc  
 1981 acttcaaacc ccagcagcat gacagacacc cctgtaacc cagcagcacc gtagcctctg  
 35 2041 ccctgtaaaa atcagactcg gaaccgatgt gtctttagg gaatttaag ttcatatcat  
 2101 ttcagagact ttaagtcagt tggttttat tagctcttg gtatgcagta acttgggtg  
 2161 aggcaaaaca ctaataaaa ggctaaaaa gaaaatgatg ctttctct atattctac  
 40 2221 tctgtacaaa taaagaagt gctgtgtt tcagaagtt aaccccttg ctgttctc  
 2281 agccctgtct acttggcac cccaccacc tattaactgt gttgtcac tctctttg  
 2341 agctctggac tggaggggta gatgggagt caattacca tcacataaat atgaaacatt  
 45 2401 tatcagaaat gttgccatt taatgagatg atttcttca tctcataatt aaaatacctg  
 2461 actttagaga gagtaaatg tccaggagc cataggaata tctgtatgt gtagacttt  
 50 2521 aatgctacat ttt

Secuencia de aminoácidos de BAG3 (SEQ ID NO: 2):  
 Referencia: NCBI PubMed, XM 055575  
 atanogen 3 asociado a BCL2 de *Homo sapiens* (BAG3), ARNm  
 gi|16156810|ref|XM - 055575.1[[16156810]]

55 MSAATHSPMMQVASGNDRDPLPPGWEIKIDPQTGWPFVDHNSRTTWNDF  
RVPSEGPKETPSSANGPSREGSRLPPAREGHPVYQQLRPGYIPIVLHEGAENR  
QVHPFHVYPQPGMQRFRTEAAAAAPQRSQSPLRGMPEQTQPKKCGQVAAAA  
 60 AAQPPASHGPERSQSPAASDCSSSSSSASLPSSGRSSLGSHQLPRGYISIPVIHE  
QNVTR

PAAQPSFHQAQKTHYPAAQQGEYQTHQPVYHKIQGDDWEPRPLRAASPFRRSSVQ  
GASSREGSPARSSSTPLHSPSPIRVHTVVDRPQQPMTHRETAPVSQPENKPEKPK  
GPVGPPELPPGHIPIQVIRKEVDSKPVVSQKPPPPSEKVEVKVPPAPVPCPPPPSPGPS  
AVPSSPKSVATEERAAPSTAPAEATPPKPGAEAPPKHPGVLKVEAILEKVQGLEQ  
5 AVDNFEGKKTDKKYLMIIEEYLTKEALLDSVDPEGRADVRQARRDGVKRVQVQVILEK  
LEQKAIDVPGVQVYELQPSNLEADQPLQAIMEMGAVAADKGGKKNAGNAEDPHT  
ETQQPEATAAATSNPSSMT  
10 DTPGNPAAP

Se sabe que la proteína BAG3 se expresa en algunas líneas celulares, tal como HeLa y A2058, y en cuanto a lo que se refiere a células humanas primarias normales, en células de músculo esquelético, cardíacas, de ovario y otros tipos de células normales (2-5). La expresión de BAG3 también se ha detectado en células tumorales de páncreas humano (6).

No se ha informado de la expresión de BAG3 en otros tipos de células primarias normales o neoplásicas antes de los resultados presentados por primera vez en el presente documento.

20 Algunos hallazgos describen que la transfección de células de la línea celular humana HeLa (5) o de la línea celular murina 32D (7) con construcciones que hiperexpresan BAG3 pueden incrementar modestamente la apoptosis celular inducida por microinyección de Bax o a través de Fas (5), o por privación de IL-3 (7), respectivamente.

En los documentos WO 00/14106 y WO 95/25125 se han descrito anticuerpos genéricos para BAG3, y sin embargo no se ha caracterizado ningún sitio inmunógeno específico para ellos. Las referencias 4-6 describen anticuerpos policlonales específicos para la región carboxi-terminal de la proteína BAG3 que comienza específicamente en el aminoácido 306. Liao describe un anticuerpo policlonal de conejo anti-BAG3 dirigido contra los 196 aminoácidos de la porción C-terminal de BAG3. Lee describe un anticuerpo policlonal contra la región de aminoácidos que abarca la porción 306-575. Dong describe un anticuerpo policlonal contra las dos regiones de aminoácidos 2 y 8.

30 El resumen de patente de la publicación japonesa 10327872 describe usos de BAG3 para el diagnóstico, la profilaxis y el tratamiento de patologías relacionadas con la apoptosis, pero sin embargo no se ha caracterizado ningún sitio inmunógeno o ningún anticuerpo específico, y además no se han realizado pruebas, en particular en humanos.

35 Antes de los resultados presentados por primera vez en el presente documento, no se había probado que la expresión de BAG3 influyese en la apoptosis de células primarias humanas, ya sean normales, neoplásicas o afectadas por otros tipos de patologías. Además, nunca se había informado de la modulación en defecto de BAG3 por reactivos tales como oligonucleótidos, que se pueden usar en células primarias, y sus efectos sobre la apoptosis celular.

40

#### **Resumen de la invención**

La presente invención se refiere a la proteína BAG3 (SEQ ID NO: 2) y a la secuencia de nucleótidos correspondiente (SEQ ID NO: 1) y a partes de ellas (indicadas por el subrayado dentro de las secuencias largas anteriormente mencionadas).

Una primera forma de realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo AC-1 secretado por el clon madre de hibridoma nº PD02009 depositado el 17/12/2002 en el Centro Biotecnologie Avanzate, Génova, caracterizado porque es un anticuerpo específico para al menos una secuencia peptídica de una proteína BAG-3 humana seleccionada del grupo constituido por: SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un clon madre de hibridoma nº PD02009 depositado el 17/12/2002 en el Centro Biotecnologie Avanzate de Génova para la producción del anticuerpo según la reivindicación 1.

55

El objeto de la presente invención se ha conseguido mediante un procedimiento de preparación del anticuerpo AC-1 secretado por el clon madre de hibridoma nº PD02009, con una construcción de Péptidos antigénicos múltiples (MAP) que comprende los siguientes péptidos BAG-3:

60 MAP-BAG3-1: NH2-DRDPLPPGWEIKIDPQ-MAP que contiene la SEQ ID NO 15  
MAP-BAG3-2: NH2-SSPKSVATEERAAPS-MAP que contiene la SEQ ID NO 16  
MAP-BAG3-3: NH2-DKGKKNAGNAEDPHT-MAP que contiene la SEQ ID NO 17

MAP-BAG3-4: NH2-NPSSMTDTPGNPAAP-MAP que contiene la SEQ ID NO 18.

Una forma de realización adicional de la presente invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo AC-1 secretado por el clon madre de hibridoma nº PD02009.

5

Una forma de realización más de la presente invención se refiere a un agente diagnóstico que comprende el anticuerpo AC-1 secretado por el clon madre de hibridoma nº PD02009, para la detección de la expresión de BAG-3 en células primarias.

10 Una forma de realización adicional de la presente invención se refiere a un kit para la identificación de la expresión de BAG-3 en células primarias que comprende el anticuerpo AC-1 secretado por el clon madre de hibridoma nº PD02009.

15 Los reactivos y composiciones para los usos descritos en la presente invención incluyen adicionalmente vectores, incluyendo vectores de expresión, virus, etc., que contienen secuencias específicas de BAG3; células manipuladas genéticamente para contener dichas secuencias y células manipuladas genéticamente para expresar dichas secuencias. Los reactivos incluyen adicionalmente el complemento de cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente.

20 Las composiciones para los usos descritos en la presente invención además pueden comprender un vehículo aceptable, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas para el uso relacionado con BAG3 relacionadas con la presente invención también son valiosas actualmente para aplicaciones veterinarias. Los receptores deseados para 25 dichas aplicaciones son particularmente animales domésticos y caballos de pura raza, además de seres humanos.

Los usos basados en BAG3 descritos en la presente invención también se refieren a reactivos y/o procedimientos y/o kits para trabajo de laboratorio o de investigación.

30 Otros objetos de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la expresión del ARNm de BAG3 (panel A) y de la proteína (panel B) en células primarias de 35 pacientes con leucemia.

La Figura 2 muestra la capacidad de modulación en defecto de BAG3 por parte de oligodesoxinucleótidos no codificantes contra BAG3 en células primarias de pacientes con leucemia.

40 La Figura 3 muestra la estimulación de la liberación del citocromo c mitocondrial por parte de oligodesoxinucleótidos no codificantes contra BAG3 en células primarias de pacientes con leucemia.

La Figura 4 muestra la estimulación de la actividad caspasa por parte de oligodesoxinucleótidos no codificantes contra BAG3 en células primarias de pacientes con leucemia.

45

La Figura 5 muestra el incremento en la unión de anexina V por parte de oligodesoxinucleótidos no codificantes contra BAG3 en células primarias de pacientes con leucemia.

La Figura 6 muestra la estimulación de la apoptosis celular de la B-CLL primaria (leucemia linfocítica crónica de 50 linfocitos B) por parte de oligodesoxinucleótidos no codificantes contra BAG3.

La Figura 7 muestra la estimulación de la apoptosis celular de la ALL primaria (leucemia linfoblástica aguda) por parte de oligodesoxinucleótidos no codificantes contra BAG3.

55 La Figura 8 muestra la capacidad de modulación en defecto de BAG3 por parte de oligodesoxinucleótidos no codificantes contra BAG3 en células U937 humanas.

La Figura 9 muestra la estimulación de la apoptosis inducida por estrés en células de la línea U937 de leucemia 60 mieloide humana por parte de oligodesoxinucleótidos no codificantes contra BAG3.

60

La Figura 10 muestra la estimulación de la apoptosis inducida por estrés en linfocitos (panel A) o monocitos (panel B) primarios de sangre periférica normal humana por parte de oligodesoxinucleótidos no codificantes contra BAG3.

La Figura 11 muestra la expresión de la proteína BAG3 y su modulación por parte de oligodesoxinucleótidos no codificantes, como se detecta en transferencia de Western (A) o en inmunofluorescencia intracelular (B).

5 La Figura 12 muestra el efecto de los oligonucleótidos no codificantes específicos de BAG3 o AraC sobre la apoptosis celular de la ALL.

La Tabla 1 describe el efecto de oligodesoxinucleótidos no codificantes contra BAG3 sobre la apoptosis en células de la línea SAOS de osteosarcoma humano.

10

La Tabla 2 describe el efecto protector de la hiperexpresión de BAG3 sobre la apoptosis inducida por estrés en la línea celular humana 293.

La Tabla 3 describe el efecto de la hiperexpresión de BAG3 sobre el crecimiento de células neoplásicas (de osteosarcoma) humanas xenoinjertadas en ratones sin pelo.

15 La Tabla 4 muestra los resultados de las pruebas de ELISA llevadas a cabo para verificar la unión de los sobrenadantes del clon madre de hibridoma a construcciones de MAP-BAG3.

20 La Figura 13 muestra la unión de los anticuerpos policlonales AC-BAG3-2 y AC-BAG3-1 a lisados procedentes de células HeLa o células de leucemia primaria (A) y de los sobrenadantes de los clones madre de hibridoma (AC-1, AC-2, AC-3, AC-4) a lisados celulares procedentes de células HeLa (B), según se detecta mediante transferencia de Western.

**25 Descripción detallada de la invención**

Los fragmentos de polinucleótidos y de aminoácidos que se consideran particularmente relevantes para la presente invención y que están comprendidos en las SEQ ID NO: 1 y 2 están indicados a continuación. Dichas secuencias son relevantes debido a que son específicas de BAG3 y no son compartidas con ninguna otra secuencia conocida de otros genes o proteínas BAG:

30

SEQ ID NO: 3

gcggagctcc gcatccaacc ccgggcccgc gccacttt ttgactgga ccagaagtt ctgccggcc  
 35 agtgctacc tcccttacc tctcctcc cctctggcag cgaggaggct attccagac actccaccc  
 ctctctggcc acgtcacccc cgccttaaat tcataaagg gcccggcgc ggctcccgg acacgtcggc  
 ggcggagagg ggcccacggc ggcggcccgc ccagagactc ggcgcccga gccagcggc  
 40 cgcacccgcg cccagcggg cagacccaa ccagcatga ggcgcccac cactcggc  
 atgatgcagg tggcgtccg caacggtag

SEQ ID NO: 4: MSAATHSPMMQVASGNGDRDPLPPGWEIKIDPQTG

SEQ ID NO: 5

gtgcc ctctgagggc cccaaggaga ctccatctc tgccaatggc cctcccggg agggctctag  
 45 gctgccgct gctaggaag gccaccctgt gtaccccag ctccgaccag gctacattc cattcctgt  
 ctccatgaag gcgctgaaa ccggcagggt cacccttcc atgtctatcc ccagcctggg atgcagcgt  
 tccgaactga ggcggcagca gcggctctc agaggcca gtcacctctg cggggcatgc  
 50 cagaaaccac tcagccagat aaacagtgtg gacagggtgc agcggcggcg gcagcccagc  
 cccagcctc ccacggacct gagcggctcc agtctccagc tgctctgac tgctcatct catctcctc  
 ggccagcctg cctcctccg gcaggagcag cctgggagc caccagctcc cgcgggggta catctcatt  
 55 ccggtgatac acgagcagaa cgttaccgg ccagcagccc agcctcctt ccaccaagcc  
 cagaagcgc actaccagc gcagcagggg gactaccaga cccaccagcc tgtgtaccac  
 aagatccagg gggatgactg ggagccccg cccctcggg cggcatccc gttcaggta tctgtccagg  
 60 gtgcatcgag cgggagggc tcaccagcca ggagcagcac gccactccac tcccctcgc ccatccgtg  
 gcacaccgtg gtcgacagc ctacagcacc catgacccat cgagaaactg cacctgttc ccagcctgaa  
 acaaaccag aaagtaagcc aggccagtt ggaccagaac tccctctgg acacatcca attcaagtga

tccgcaaaga ggtggattct aaacctgttt cccagaagcc cccacctccc tctgagaagg tagaggtgaa  
 agttccccct gctccagttc ctgtctctcc tcccagccct ggcccttctg ctgtcccctc tcccccaag  
 5 agtgtggcta cagaagagag ggcagcccc agcactgccc ctgcagaagc tacacctcca  
 aaaccaggag aagccgaggc tccccaaaa catccaggag

SEQ ID NO: 6

10 NDPRVPSEGPKETPSSANGPSREGSRLPPAREGHPVYPQLRPGYIPIVLHEGA  
 ENRQVHPFHVYPQPGMQRFRTEAAAAAPQRSQSPLRGMPETTQPKQCGQVA  
 AAAAAQPPASHGPERSQSPAASDCSSSSSSASLPSSGRSSLGSHQLPRGYISIP  
 15 VIHEQNVTRPAAQPSFHQAQKTHYPAQQGEYQTHQPVYHKIQGDDWEPRPLRA  
 ASPFRSSVQGASSREGSPARSSTPLHSPSPIRVHTVDRPQQPMTHRETAPVS  
 QPENKPESKPGPVGPELPPGHIPIQVIRKEVDSKPVSKPPPPSEKVEVKVPPAP  
 20 VPCPPSPGPSAVPSSPKSVATEERAAPSTAPAEATPPKPGAEAPPKHPGVLK  
 VEAILEKVQGLEQAVDNFEG

SEQ ID NO: 7

25 attgatgtcc caggtcaagt ccaggtctat gaactccagc ccagcaacct tgaagcagat cagccactgc  
 aggcaatcat ggagatgggt gccgtggcag cagacaaggg caagaaaaat gctggaaatg  
 cagaagatcc ccacacagaa acccagcagc cagaagccac agcagcagcg acttcaaacc  
 30 ccagcagcat gacagacacc cctggaacc cagcagcacc gtagcctctg ccctgtaaaa atcagactcg  
 gaaccgatgt gtgcttagg gaatttaag ttcagatcat ttcagagact ttaagtcaat tggttttat  
 tagctgcttg gtatgcagta acttgggtgg aggcaaaaca ctaataaaag ggctaaaaag gaaaatgatg  
 35 ctttctct atattcttac tctgtacaaa taaagaagtt gctgtgtt tcagaagttt aaccccggtg ctgttctgc  
 agccctgtct acttgggcac cccaccacc ttttagctgt ggtgtgcac tgtctttgt agctctggac  
 tggaggggta gatggggagt caattacca tcacataaat atgaacatt tatcagaaat gttgccattt  
 40 taatgagatg atttctca ttcataatt aaaatacctg acttagaga gagtaaaatg tgccaggagc  
 cataggaata tctgtatgt gtagtacttt aatgctacat ttt

SEQ ID NO: 8

45 **ELQPSNLEADQPLQAIMEMGAVAADKGKKNAGNAEDPHTETQQPEATAAATSN**  
**PSSMTDTPGNPAAP**

Los experimentos realizados en nuestros laboratorios indican que, por primera vez, oligonucleótidos no codificantes  
 50 específicos son capaces de modular, en células primarias humanas y en líneas celulares humanas, los niveles de  
 proteína BAG3; estos oligonucleótidos no codificantes modulan también la supervivencia y/o muerte, ya sea  
 espontánea o en respuesta al tratamiento, de células primarias humanas y líneas celulares humanas. Los  
 experimentos con células primarias, que son la diana de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, son  
 particularmente relevantes, y los resultados no se podían predecir de los datos obtenidos con líneas celulares,  
 55 puesto que las líneas celulares estables y las células primarias tienen una sensibilidad diferente a moduladores de la  
 supervivencia y/o muerte celular (14-18); además, el efecto de la modulación en defecto de la proteína BAG3 sobre  
 la supervivencia y/o muerte celular, ya sea en líneas celulares o en células primarias, no había sido presentado  
 anteriormente, ni se podía haber predicho de los datos relativos a la hiperexpresión de BAG3, ya que se han  
 presentado varios ejemplos, en los que la sobreexpresión de una proteína (es decir, las proteínas de la familia Bcl-2)  
 60 puede proteger a las células de agresiones pro-apoptóticas, pero su modulación en defecto no estimula la apoptosis  
 (19-21); en último lugar, la modulación en defecto de BAG3 se ha obtenido con oligonucleótidos no codificantes  
 específicos, que se pueden utilizar para investigación, diagnosis y/o terapia, y su eficacia no era predecible antes del

trabajo experimental, puesto que no todos los oligonucleótidos no codificantes contra un ARNm específico presentan actividades comparables cuando se introducen en una célula, y además algunas moléculas no codificantes pueden ejercer efectos impredecibles no deseados, tales como citotoxicidad (22-23).

- 5 La modulación de BAG3 es capaz de influir en el desarrollo de un tumor humano *in vivo*; estos resultados son necesarios para aplicaciones *in vivo*, son un requerimiento absoluto para proporcionar la actividad biológica de un gen y/o una proteína y los efectos de su modulación en organismos pluricelulares, y no se pueden extrapolar en este aspecto a los resultados *in vitro* (1).
- 10 Basándose en el efecto de la modulación de la apoptosis de los oligonucleótidos no codificantes según la invención, se ha diseñado un panel de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra construcciones peptídicas (MAP-BAG3-péptido) para: mapear diferentes epitopos y/o dominios de BAG3; relacionarlos con la actividad funcional de BAG3 (es decir, modulación de la supervivencia celular); relacionarlos con la interacción bioquímica específica con pares moleculares y/o formación de complejos; dirigirlos para neutralizar (anticuerpos antagonistas) o desencadenar (anticuerpos agonistas) la actividad funcional de BAG3.
- 15

Identificación de la expresión de BAG3 en células de leucemia humana primarias y eficacia de los oligonucleótidos no codificantes específicos en la modulación de los niveles de BAG3 y en la supervivencia y/o muerte celular

- 20 Analizamos por PCR la expresión del ARNm de BAG3 en células primarias procedentes de pacientes con B-CLL. El ARNm de BAG3 era detectable en dichas células, y sus niveles parecían estar incrementados por el tratamiento con un compuesto quimioterapéutico, el fosfato de fludarabina (Figura 1, panel A).

- Para explorar los niveles de proteína BAG3, primero usamos un anticuerpo policlonal según las enseñanzas de la solicitud de patente WO 95/25125. Dicho anticuerpo parece unirse con una baja avidéz a la proteína BAG3 procedente de células leucémicas primarias y, por tanto, debía ser usado en condiciones de alta resolución (alta concentración de anticuerpo, periodos de incubación prolongados, etc.). Por tanto decidimos producir nuevos anticuerpos policlonales usando una aproximación diferente, es decir, usando un Péptido antigénico múltiple (MAP) preparado en una sola síntesis mediante el procedimiento en fase sólida descrito en la referencia 24-26. Dicha aproximación permite aumentar la inmunogenicidad de los péptidos antigénicos y obtener anticuerpos particularmente eficientes (24-26). Esto es de gran importancia para detectar proteínas expresadas en bajas cantidades, como ocurre habitualmente para muchas proteínas importantes en condiciones fisiológicas o patológicas en células primarias. El tipo de MAP usado en el presente documento, así como para la posterior producción de hibridomas (véase a continuación) era un MAP de ocho ramas constituido por una matriz central compuesta de tres niveles lisina y ocho aminoácidos terminales para el anclaje de los antígenos peptídicos. En este caso, usamos el péptido NPSSMTDTPGNPAAP (SEQ ID NO: 18), correspondiente a los últimos 15 aminoácidos de la región carboxi-terminal de la proteína BAG3. Para obtener anticuerpos policlonales, se inmunizaron dos conejos con 4 inóculos (un inóculo cada dos semanas) de MAP-BAG3-4 (400 microgramos para cada inóculo); finalmente el suero se probó frente a MAP-BAG3-4 en una prueba de ELISA y se verificó que era positivo. Nosotros denominamos a los dos anticuerpos policlonales, obtenidos a partir de los dos conejos, AC-BAG3-1 y AC-BAG3-2: ambos reconocían la región carboxi-terminal de la proteína BAG3 y eran eficaces en la detección de la proteína BAG3, ya sea en transferencia de Western o en inmunofluorescencia, en células primarias, como se muestra en las FIGS. 1, 2, 11, 13.

- Con estos anticuerpos específicos de BAG3 analizamos por inmunofluorescencia la expresión de la proteína BAG3, que era detectable en células primarias procedentes de pacientes con B-CLL y cuyos niveles parecían haber aumentado por el tratamiento con fludarabina (Figura 1, panel B). En una investigación exhaustiva de 18 especímenes diferentes con B-CLL, 13 presentaban niveles detectables de proteína BAG3, y en 11 de éstos, los niveles de BAG3 estaban regulados por incremento por el tratamiento con fludarabina.

- 50 Estos hallazgos por primera vez demuestran que la expresión de BAG3 se puede detectar en células leucémicas primarias y se puede modular mediante terapia. Dichos resultados describen un uso diagnóstico y/o pronóstico, no mostrado anteriormente, de reactivos que detectan BAG3 en leucemias.

Para ser capaces de modular la expresión de BAG3, construimos los siguientes oligonucleótidos no codificantes basados en BAG3:

oligonucleótido no codificante 1: TGCATCATGG GCGAGTGGGT GGCGG, (SEQ ID NO: 9)

oligonucleótido no codificante 2: GCTCATGCTG GGTGGGGTC TG, (SEQ ID NO: 10)

oligonucleótido no codificante 3: ATTAAGGCG GGGGTGACGT GG, (SEQ ID NO: 11)

- 60 y control sin sentido:

sin sentido 1: TTATATTCTATTATATTTATGAACTCC, (SEQ ID NO: 12)

sin sentido 2: CCTCGTAACCACCG ACCTCAAT, (SEQ ID NO: 13)



sin sentido 3: GCTTATGGAG GATTGAGGTT GG. (SEQ ID NO: 14)

Se pueden construir otros oligonucleótidos, funcionalmente análogos a los mencionados anteriormente, en particular, los oligonucleótidos se pueden construir basándose en las secuencias indicadas como SEQ ID NO: 3, 5, 7.

Dentro del alcance de la presente invención están las secuencias de nucleótidos y péptidos que presentan equivalencia funcional con las secuencias identificadas en la descripción o que tienen una homología de al menos el 75%, preferentemente una homología de al menos el 80%, más preferentemente una homología de al menos el 90%, más preferentemente una homología de al menos el 95%, incluso más preferentemente una homología de al menos el 98% con al menos una de las secuencias mencionadas en esta descripción.

La administración de oligonucleótidos no codificantes, pero no de oligonucleótidos sin sentido, en células leucémicas primarias humanas *ex vivo* dio como resultado una modulación en defecto de los niveles de proteína BAG3. En la Figura 2 se muestran resultados representativos; se obtuvieron resultados análogos en experimentos con tres especímenes diferentes con B-CLL. Estos hallazgos describen el uso, no mostrado con anterioridad, de oligonucleótidos no codificantes de BAG3 para modificar los niveles de la proteína BAG3 en células primarias (en este caso neoplásicas, y específicamente leucémicas).

A continuación analizamos si los oligonucleótidos no codificantes, mediante la modulación en defecto de los niveles de la proteína BAG3, podrían afectar a la apoptosis celular. Células primarias procedentes de pacientes leucémicos se incubaron con o sin oligonucleótidos no codificantes o control y/o fludarabina, y se analizaron diferentes acontecimientos de la apoptosis: liberación del citocromo c mitocondrial (8), activación de la caspasa 3 (9), unión de la anexina V (10) y aparición de elementos hipodiploides (11). Un análisis exhaustivo de 15 muestras de B-CLL indicaba que la administración de oligonucleótidos no codificantes, pero no de oligonucleótidos sin sentido, a las células dio como resultado la estimulación de la liberación del citocromo c mitocondrial (Figura 3), la actividad caspasa (Figura 4), la unión de anexina V (Figura 5) y la aparición de elementos hipodiploides (Figura 6). La estimulación de la apoptosis se vio incluso más amplificada por la adición de fludarabina (Figura 6). Además, en 4 de los 4 especímenes con ALL analizados, el efecto pro-apoptótico de los oligonucleótidos no codificantes solos fue particularmente remarcable, puesto que el porcentaje de elementos hipodiploides alcanzó >60% de las células (similar al valor obtenido con el compuesto quimioterapéutico AraC) (Figura 7).

Por tanto, hemos demostrado por primera vez que la modulación en defecto de los niveles de proteína BAG3 mediante la administración de oligonucleótidos no codificantes de BAG3 a diferentes tipos de células humanas de leucemia primaria pueden estimular la apoptosis. El efecto pro-apoptótico es remarcable cuando los oligonucleótidos no codificantes se administran solos y puede ser sinérgico con el de diferentes compuestos terapéuticos.

Estos hallazgos describen el posible uso, no mostrado con anterioridad, de los reactivos que modulan BAG3, tales como los oligonucleótidos no codificantes, para modular la supervivencia y/o muerte en células primarias humanas, en este caso neoplásicas, y específicamente leucémicas. También indican el posible uso de dichos reactivos en sinergia con otros fármacos.

Se obtuvieron resultados adicionales usando células humanas de diferentes tipos: células de osteosarcoma de la línea SAOS, en las que detectamos un efecto pro-apoptótico remarcable de los oligonucleótidos no codificantes solos (Tabla 1); y células mieloides de la línea U937, en las que el oligonucleótido no codificante de BAG3 podría aumentar la apoptosis inducida por estrés (Figura 9). Particularmente, el aumento de la apoptosis inducida por estrés en células U937 nos sugería verificar si los reactivos basados en BAG3 podrían interferir también con los efectos del estrés en células primarias humanas. Por tanto, administramos los oligonucleótidos no codificantes o control a linfocitos o monocitos humanos *ex vivo* de sangre periférica normal, tratados con los inductores de estrés maleato de dietilo (DEM) y 2-metoximetilestradiol (2-ME). Los oligonucleótidos no codificantes, pero no los oligonucleótidos control, aumentaron enormemente la apoptosis celular en estas células (Figura 10). Estos hallazgos por primera vez demuestran que los efectos del estrés sobre células primarias humanas (en este caso, células normales, y específicamente linfocitos y monocitos de sangre periférica) se pueden modular mediante reactivos basados en BAG3.

Investigamos si se podría obtener la protección frente a la muerte celular con reactivos basados en BAG3. Por tanto, transfectamos células de la línea 293 con una construcción que hiperexpresa BAG3 y verificamos el efecto sobre la apoptosis inducida por estrés. La transfección con la construcción BAG3 dio como resultado la protección frente a la apoptosis inducida por estrés (Tabla 2).

Los resultados descritos anteriormente indican por primera vez que: 1) BAG3 se expresa en células leucémicas primarias humanas; 2) los niveles de proteína BAG3, y la muerte espontánea o inducida por terapia de células

primarias humanas se puede modular usando oligonucleótidos no codificantes específicos.

Cabe destacar que ésta es la primera observación publicada de que oligonucleótidos no codificantes de BAG3 específicos son capaces de aumentar la apoptosis de células primarias humanas. Previamente se ha demostrado que la sobreexpresión de BAG3 en líneas celulares transfectadas podría protegerlas parcialmente de la apoptosis inducida a través de Fas o la privación del factor de crecimiento (5, 7). Nuestra invención no se podía predecir a partir de dicha observación previa, por tres razones: 1) las líneas celulares estables y las células primarias tienen una sensibilidad diferente a moduladores de la supervivencia y/o muerte celular (14-18); 2) se han publicado varios ejemplos, en los que la sobreexpresión de una proteína (es decir, proteínas de la familia Bcl-2) puede proteger a las células de las agresiones pro-apoptóticas, pero su modulación en defecto no estimula la apoptosis (19-21); 3) no todos los oligonucleótidos no codificantes contra un ARNm específico presentan actividades comparables cuando se introducen en una célula; además, algunas moléculas no codificantes pueden ejercer efectos impredecibles no deseados, tales como citotoxicidad (22-23). Por tanto, las propiedades de las secuencias de oligonucleótidos no codificantes específicas usadas por nosotros no se podían haber predicho antes de nuestro trabajo experimental.

Esta es la primera observación publicada de expresión de BAG3 en células leucémicas primarias humanas. Esto no se podía predecir de resultados previos descritos en líneas celulares estables y células primarias distintas de células leucémicas. De hecho: a) las líneas celulares ya no están sometidas a las influencias ambientales de un organismo pluricelular, y además, y aún más importante, se seleccionan para su supervivencia en cultivo: por tanto, normalmente difieren en la expresión génica y/o en los niveles de proteínas particulares con respecto a células primarias, incluso cuando pertenecen al mismo tipo; b) tipos celulares diferentes, ya sean líneas celulares o células primarias, difieren en la expresión génica y/o en los niveles de proteínas particulares (14-19).

Por último, puesto que hemos demostrado que la modulación de los niveles de proteína BAG3 puede modular la supervivencia y/o muerte celular en células primarias, también los polinucleótidos y los polipéptidos codificados correspondientes indicados por las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 16, 17, 18 y las construcciones que los comprenden (construcciones que hiperexpresan, ya sea en plásmidos u otros vectores; ADN desnudo; etc.) que modulan positivamente dichos niveles son relevantes en esta actividad funcional. Particularmente, hemos demostrado que el efecto funcional es específico de BAG3 y no es compartido con otras proteínas BAG, y por tanto las SEQ ID NO 3, 5 y 7 se identifican como particularmente relevantes para el efecto funcional (es decir, modulación de la supervivencia y/o muerte celular).

#### Demostración de que la modulación de BAG3 puede influir en el desarrollo tumoral in vivo

Se ha informado de que la hiperexpresión de BAG3 suprime la apoptosis en líneas celulares *in vitro*, puesto que la sobreexpresión de BAG3 en líneas celulares transfectadas podría protegerlas parcialmente de la apoptosis inducida a través de Fas o la privación del factor de crecimiento (5, 7). Estos resultados no permitían predecir el efecto de la hiperexpresión de BAG3 sobre el desarrollo tumoral *in vivo*. De hecho, los tumores *in vivo* están sometidos a las influencias ambientales de un organismo pluricelular, y moléculas que tienen una actividad específica *in vitro* pueden no presentar sus efectos o presentar actividades *in vivo* diferentes: por tanto, los efectos *in vivo* no se pueden extrapolar de los resultados obtenidos *in vitro* y es necesario un trabajo experimental *in vivo* específico (1). Transfectamos células de la línea celular SAOS de osteosarcoma humano con un vector plasmídico que sobreexpresa BAG3 y obtuvimos un cultivo en masa de células transfectadas de manera estable. Las células de tipo silvestre, las células transfectadas y un control, un cultivo transfectado con un vector vacío, se inyectaron en tres lugares diferentes (espalda, y costados derecho e izquierdo) en ratones sin pelo. Las células control y las células de tipo silvestre no dieron lugar a ningún tumor, mientras que las células que hiperexpresan BAG3 desarrollaron tumores detectables, lo que demuestra que la modulación de BAG3 puede influir en el desarrollo de un tumor *in vivo* (Tabla 3).

#### 50 Diseño y construcción de un panel de anticuerpos policlonales y monoclonales

Se generaron anticuerpos contra construcciones peptídicas (MEP-BAG3-péptidos) para reconocer y/o hacer funcionar los siguientes epítomos y/o dominios definidos de BAG3:

55 SEQ ID NO 15: DRDPLPPGWEIKIDPQ;  
SEQ ID NO 16: SSPKSVATEERAAPS;  
SEQ ID NO 17: DKGKKNAGNAEDPHT;  
SEQ ID NO 18: NPSSMTDTPGNPAAP

60 de importancia funcional en células primarias humanas y otros tipos celulares de orígenes diferentes.

Todos los oligonucleótidos no codificantes descritos anteriormente fueron capaces de modular en defecto los niveles

de proteína BAG3. Esto es importante para la posterior modulación de la muerte celular, presentada por primera vez en el presente documento.

La actividad funcional de BAG3 en la modulación de la supervivencia y/o muerte celular puede depender de las interacciones bioquímicas de epítomos y/o dominios específicos de BAG3 indicados por las SEQ ID NO 16, 16, 17, 18 con pares moleculares involucrados en la vía de supervivencia/muerte (2). De hecho, se han detectado una variedad de dichos pares para proteínas BAG en general, y BAG3 en particular (2-5); dichas interacciones potencialmente pueden involucrar diferentes partes de la molécula, tales como, además del dominio BAG, el dominio WW, la parte rica en SER, la parte rica en PRO, etc. (descrito en 2-5). En vista de la actividad funcional de BAG3 en la modulación de la supervivencia celular, es importante poder mapear diferentes epítomos y/o dominios de BAG3: esto puede permitir: 1) relacionar dichos epítomos con la actividad funcional de BAG3; 2) identificar el sitio(s) de interacciones con pares conocidos, así como nuevos sitios de interacciones con pares aún por describir; 3) interferir con la formación de complejos con pares moleculares; 4) bloquear o mimetizar la interacción con estos pares, dando lugar a la modulación de la actividad funcional de BAG3.

Para producir herramientas eficaces capaces de abordar los problemas anteriormente mencionados, decidimos obtener anticuerpos contra péptidos específicos que representan porciones espacialmente distintas de la proteína BAG3. Dichos anticuerpos son deseables para: mapear epítomos y/o dominios diferentes de BAG3; relacionarlos con la actividad funcional de BAG3 (es decir, la modulación de la supervivencia celular); relacionarlos a interacciones bioquímicas específicas con pares moleculares y/o la formación de complejos; dirigirlos para neutralizar (anticuerpos antagonistas) o desencadenar (anticuerpos agonistas) la actividad funcional de BAG3.

Nosotros hemos identificado los siguientes péptidos espacialmente distintos derivados de BAG3:

(SEQ ID NO 15): DRDPLPPGWEIKIDPQ;  
 (SEQ ID NO 16): SSPKSVATEERAAPS;  
 (SEQ ID NO 17): DKGKKNAGNAEDPHT;  
 (SEQ ID NO 18): NPSSMTDTPGNPAAP. Dicho péptido correspondía a uno que habíamos usado para generar anticuerpos policlonales (véase anteriormente). Su uso aquí está dirigido a obtener anticuerpos contra la parte carboxi-terminal de BAG3 (de hecho, hasta ahora sólo ha habido anticuerpos policlonales contra dicha parte: véase referencias 4-6). Por otra parte, su uso es además del uso de los otros tres péptidos, y no alternativamente al mismo (SEQ ID NO. 15, 16 y 17).

Nosotros usamos estos péptidos para obtener anticuerpos separados contra cada uno de los cuatro péptidos.

Los cuatro péptidos son específicos de la proteína BAG3 y no se encuentran en ninguna otra proteína, incluyendo otras proteínas BAG.

Para inmunizar a los animales, decidimos usar MAPs (péptidos antigénicos múltiples) (24-26). Como se ha descrito en la sección previa, la construcción de MAPs permite aumentar significativamente la inmunogenicidad de los péptidos antigénicos y obtener anticuerpos particularmente eficientes. Esto es importante para detectar proteínas expresadas en bajas cantidades, como ocurre habitualmente con muchas proteínas relevantes en condiciones fisiológicas o patológicas en células primarias. Siguiendo esta aproximación, obtuvimos las siguientes construcciones de MAP únicas:

- MAP-BAG3-1: NH<sub>2</sub>-DRDPLPPGWEIKIDPQ-MAP que contiene (SEQ ID NO 15)
- MAP-BAG3-2: NH<sub>2</sub>-SSPKSVATEERAAPS-MAP que contiene (SEQ ID NO 16)
- MAP-BAG3-3: NH<sub>2</sub>-DKGKKNAGNAEDPHT-MAP que contiene (SEQ ID NO 17)
- MAP-BAG3-4: NH<sub>2</sub>-NPSSMTDTPGNPAAP-MAP que contiene (SEQ ID NO 18).

La producción de los anticuerpos policlonales ha sido descrita anteriormente. En este aspecto, para la producción de anticuerpos, las construcciones de MAP se deben considerar únicas y diferentes de los péptidos simples solos, puesto que su capacidad para provocar respuestas inmunógenas en el animal es diferente de la de los péptidos usados en solitario (24-26).

Los anticuerpos monoclonales (aún no presentados en la bibliografía) eran muy demandados, en general debido a la alta especificidad y homogeneidad de dichos reactivos, pero también en particular en vista de nuestros resultados que demuestran las propiedades moduladoras de la apoptosis de la proteína BAG3 en células primarias. De hecho, las proteínas BAG, incluyendo BAG3, interaccionan con diversos pares moleculares (2-5, 7), y son necesarios anticuerpos monoclonales para mapear los epítomos de las proteínas involucradas en la interacción con pares específicos, dando así lugar a efectos sobre la supervivencia y/o muerte celular. Por otra parte, los anticuerpos monoclonales pueden presentar propiedades agonistas o antagonistas con respecto a las funciones biológicas de

una proteína, y esto es importante para la potencial aplicación en la modulación de la actividad de BAG3 en la supervivencia y/o muerte celular.

Para obtener los anticuerpos, seguimos procedimientos habituales, ya realizados en nuestro laboratorio (12).  
5 Específicamente:

- nueve ratones hembra Balb/c de cuatro semanas se inmunizaron con 4 inóculos (un inóculo cada 2 semanas) de los 4 MAP-BAG3 juntos (200 µg cada uno, es decir, 800 µg de proteína total/ratón/inóculo). A continuación se extrajeron los bazo y se fusionaron con células de mieloma (NS0) para obtener clones madre de anticuerpos  
10 monoclonales. Éstos se probaron frente a cada uno de los cuatro MAP-BAG3 en pruebas de ELISA (véase Tabla 4).

Nosotros produjimos:

- nueve clones madre de anticuerpo murino (AC-1, AC-2, AC-3, AC-4, AC-5, AC-6, AC-7, AC-8, AC-9) obtenidos de  
15 ratones inmunizados con los cuatro MAP-BAG3 juntos. Los nueve clones madre están siendo subclonados actualmente para obtener hibridomas contra cada una de las cuatro construcciones de MAP-BAG3. Las pruebas de ELISA de los anticuerpos producidos por los nueve clones madre se presentan en la Tabla 4. De manera importante, las pruebas de ELISA demuestran que los clones madre contienen hibridomas capaces de reconocer cada uno de los cuatro MAP-BAG3 usados. Por tanto, los nueve clones madre ya contienen varios hibridomas específicos, cada  
20 uno de los cuales puede reconocer uno de los cuatro epítomos representados en los MAPs y, por tanto, se pueden usar para mapear un epítomo de BAG3 e interferir con sus interacciones y actividades funcionales; los hibridomas mono-específicos están siendo separados actualmente mediante procedimientos de subclonación.

-La detección, mediante análisis de transferencia de Western, de proteína BAG3 en lisados procedentes de la línea  
25 celular HeLa y células de leucemia primarias se muestra en la FIG. 13. Específicamente:

- los anticuerpos procedentes de los nueve clones madre reconocían las cuatro construcciones MAP-BAG3 en la prueba de ELISA (Tabla 4);

30 - cuatro de ellos ya han sido probados, con resultados positivos en transferencia de Western con lisados de HeLa (FIG. 13, panel B).

En conclusión, los nueve clones madre de anticuerpo murino (AC-1, AC-2, AC-3, AC-4, AC-5, AC-6, AC-7, AC-8, AC-9) contienen hibridomas específicos para cada una de las cuatro construcciones MAP-BAG3, y son capaces de  
35 identificar partes espacialmente distintas de la molécula BAG3, en particular el clon madre AC-1 era el nº PD02009 depositado el 17/12/2002 en el Centro Biotecnologie Avanzate de Génova. Por tanto se pueden usar para: mapear diferentes epítomos y/o dominios de BAG3; relacionarlos con la actividad funcional de BAG3 (es decir, modulación de la supervivencia celular); relacionarlos a una interacción bioquímica específica con pares moleculares y/o la formación de complejos; dirigirlos para neutralizar (anticuerpos antagonistas) o desencadenar (anticuerpos  
40 agonistas) la actividad funcional de BAG3.

Las características originales de estos resultados son:

- el efecto de modulación en defecto de oligonucleótidos no codificantes constituye la razón de ser original, no  
45 predecible con anterioridad, que da lugar a la necesidad de mapear y hacer funcionar los epítomos de BAG3 que median en los mecanismos de modulación de la apoptosis. Esto constituía la premisa para la producción de un panel de anticuerpos generados contra regiones diferentes de la proteína BAG3;

50 - se ha obtenido un panel de nueve clones madre que producen anticuerpos (AC-1; AC-2; AC-3; AC-4; AC-5; AC-6; AC-7; AC-8; AC-9) y se pueden usar para: mapear diferentes epítomos y/o dominios de BAG3; relacionarlos con la actividad funcional de BAG3 (es decir, modulación de la supervivencia celular); relacionarlos a una interacción bioquímica específica con pares moleculares y/o la formación de complejos; dirigirlos para neutralizar (anticuerpos antagonistas) o desencadenar (anticuerpos agonistas) la actividad funcional de BAG3;

55 - se han obtenido dos anticuerpos policlonales (AC-BAG3-1 y AC-BAG3-2), capaces de revelar la presencia de la proteína BAG3 en leucemias primarias humanas y la expresión modulada de la proteína BAG3 mediante oligodesoxinucleótidos no codificantes específicos.

La proteína BAG3, el polinucleótido correspondiente, las partes correspondientes de ellos y los oligonucleótidos no  
60 codificantes correspondientes se pueden usar para investigación, diagnosis y terapia, por ejemplo en leucemias, otras neoplasias y enfermedades involucradas en la muerte celular, y para la modulación de la supervivencia y/o muerte celular. Los reactivos basados en BAG3 incluyen de una manera no limitante oligonucleótidos, cebadores,

sondas, (poli)péptidos o proteínas, anticuerpos policlonales o monoclonales, etc., y cualquier otro reactivo capaz de detectar o modular la expresión de BAG3.

Los hallazgos ilustrados en la presente invención y obtenidos con los reactivos basados en BAG3 descritos se podrían obtener con reactivos modificados que tuvieran actividades equivalentes. Estos últimos, por tanto, se consideran equivalentes a los ilustrados en la presente invención.

Particularmente, en lo que se refiere a la proteína o sus partes, o los polipéptidos, se consideran equivalentes:

- 10 - (poli)péptidos o proteínas de origen natural, que son (poli)péptidos o proteínas producidas por células que no han sido manipuladas genéticamente y específicamente se contemplan diversos (poli)péptidos o proteínas generados a partir de modificaciones post-traduccionales del (poli)péptido o la proteína incluyendo, pero no limitado a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación;
- 15 - derivados, que son (poli)péptidos o proteínas químicamente modificados por técnicas tales como ubiquitinación, marcaje (por ejemplo, con radionúclidos, fluorocromos o diversas enzimas), PEGilación (derivación con polietilenglicol) e inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que normalmente no aparecen en proteínas humanas;
- 20 - variantes recombinantes, que son (poli)péptidos o proteínas que difieren de los (poli)péptidos o proteínas de origen natural por inserciones, eliminaciones, y sustituciones de aminoácidos, creadas usando técnicas de ADN recombinante. Las directrices en la determinación de que restos aminoácidos se pueden sustituir, añadir o eliminar sin abolir las actividades de interés, tales como el tráfico celular, se pueden encontrar comparando la secuencia del polipéptido particular con la de los péptidos homólogos y minimizando el número de cambios introducidos en la secuencia de aminoácidos en regiones de alta homología.

Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos son el resultado de reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene unas propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, reemplazos de aminoácidos conservativos. Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar en base a la similitud de la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o naturaleza anfipática de los restos involucrados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen la alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina; los aminoácidos polares incluyen la glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen la arginina, lisina, e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico. Las variaciones permitidas se pueden determinar experimentalmente introduciendo de manera sistemática inserciones, eliminaciones, o sustituciones de aminoácidos en una molécula polipeptídica usando técnicas de ADN recombinante y sometiendo a ensayo para su actividad a las variantes recombinantes resultantes.

Alternativamente, cuando se desea la alteración de la función, se pueden introducir inserciones, eliminaciones o alteraciones no conservativas por ingeniería genética para producir (poli)péptidos o proteínas alteradas. Dichas alteraciones pueden, por ejemplo, alterar una o más funciones biológicas o características bioquímicas. Por ejemplo, dichas alteraciones pueden cambiar las características del (poli)péptido o la proteína tales como las afinidades de unión al ligando, las afinidades intercatenarias, o la tasa de degradación/renovación. Además, dichas alteraciones se pueden seleccionar para así generar (poli)péptidos o proteínas que estén mejor adaptados para la expresión, el escalado y similares en las células hospedadoras seleccionadas para su expresión. Por ejemplo, los restos de cisteína se pueden eliminar o sustituir con otros restos de aminoácidos con el fin de eliminar los puentes disulfuro.

Sustancialmente equivalente pueden ser secuencias de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, una secuencia mutante, que varía con respecto a una secuencia de referencia por una o más sustituciones, eliminaciones, o adiciones, cuyo efecto neto no da como resultado una disimilitud funcional adversa entre las secuencias de referencia y objeto. Normalmente, dicha secuencia sustancialmente equivalente varía de la secuencia de referencia en no más de un 20% aproximadamente, es decir, el número de sustituciones, adiciones, y/o eliminaciones de restos individuales en una secuencia sustancialmente equivalente, comparada con la secuencia de referencia correspondiente, dividido por el número total de restos en la secuencia sustancialmente equivalente es de 0,2 aproximadamente o inferior. Se dice que dicha secuencia tiene una identidad de secuencia del 80% con la secuencia listada. En una forma de realización, una secuencia mutante sustancialmente equivalente de la invención varía con respecto a una secuencia listada en no más del 10% (identidad de secuencia del 90%); en una variación de esta forma de realización, en no más del 5% (identidad de secuencia del 95%); y en una variación adicional de esta forma de realización, en no más del 2% (identidad de secuencia del 98%). Comparada con la identidad de los aminoácidos, la secuencia(s) de nucleótidos sustancialmente equivalente de la invención puede tener un porcentaje inferior de identidades de secuencia, teniendo en cuenta, por ejemplo, la redundancia o degeneración del código genético. Para los propósitos de la presente invención, las secuencias que tienen una actividad biológica

sustancialmente equivalente y unas características de expresión sustancialmente equivalentes se consideran sustancialmente equivalentes. Con el fin de determinar la equivalencia, se debe descartar el truncamiento de la secuencia madura (por ejemplo, mediante una mutación, que crea un codón de detención falso).

- 5 Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichas secuencias sustancialmente equivalentes, secuencias con el porcentaje de identidad mencionado, se pueden aislar e identificar de manera rutinaria mediante procedimientos de hibridación habituales muy conocidos por aquellos expertos en la materia.

- 10 Cuando se desee, se puede diseñar un vector de expresión para que contenga una secuencia señal o líder que dirigirá el polipéptido a través de la membrana de una célula. Dicha secuencia puede estar presente de manera natural o se puede suministrar a partir de fuentes de proteínas heterólogas mediante técnicas de ADN recombinante.

- 15 Las variantes recombinantes que codifican estos mismos (poli) péptidos o proteínas, o (poli) péptidos o proteínas similares, se pueden sintetizar o seleccionar usando la redundancia del código genético. Se pueden introducir diversas sustituciones en los codones, tales como cambios silenciosos, que producen diversos sitios de restricción, para optimizar la clonación en un plásmido o vector vírico o su expresión en un sistema procarionota o eucariota particular. Las mutaciones en la secuencia de polinucleótidos se pueden reflejar en el polipéptido o en los dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar características tales como las afinidades de unión al ligando, las afinidades intercatenarias, o la tasa de degradación/renovación.

- 25 Partes de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos relacionada con BAG3 pueden estar fusionadas a moléculas transportadoras tales como inmunoglobulinas, por muchos motivos, incluyendo el incremento de la valencia de los sitios de unión de la proteína.

- Los reactivos basados en especies homólogas de BAG3 se consideran equivalentes con respecto a los usos ilustrados en la presente invención.

- 30 Las secuencias que entran dentro del alcance de la presente invención no están limitadas a secuencias específicas descritas en el presente documento, sino que también incluyen sus variaciones alélicas. La presente invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos, figuras y tablas, que no se consideran una limitación del alcance de la invención.

#### Descripción detallada de las figuras y las tablas

- 35 Figura 1 - Expresión del ARNm de BAG3 y la proteína en células primarias de pacientes con leucemia.

- Se aislaron células leucémicas procedentes de la sangre periférica de pacientes con B-CLL por centrifugación a través de Ficoll-Hypaque (13) y se cultivaron durante 24 horas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (10% FCS-RPMI), con o sin fosfato de fludarabina. Panel A: se extrajo el ARNm celular y se verificó la expresión de BAG3 mediante PCR (la expresión de GAPDH se muestra con fines comparativos); panel B: las células se permeabilizaron y se analizaron por inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo policlonal AC-BAG3-1. A= Ig de conejo control; b= células incubadas con medio de control y analizadas con anticuerpos dirigidos contra BAG3; c= células incubadas con fludarabina y analizadas con anticuerpos dirigidos contra BAG3.

- 45 Figura 2 - Modulación en defecto de los niveles de proteína BAG3 por oligodesoxinucleótidos no codificantes dirigidos contra BAG3.

- 50 Se aislaron células leucémicas procedentes de la sangre periférica de pacientes con B-CLL por centrifugación a través de Ficoll-Hypaque y se cultivaron durante 20 horas sin oligodesoxinucleótidos (b) o con oligodesoxinucleótidos no codificantes de BAG3 (b+ $\alpha$ ) u oligodesoxinucleótidos de fosforotioato sin sentido control (5  $\mu$ M) descritos en el texto. A continuación las células se permeabilizaron y se analizaron por inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo policlonal AC-BAG3-1. a= Ig de conejo control.

- 55 Figura 3 - Efecto de oligodesoxinucleótidos no codificantes dirigidos contra BAG3 sobre la liberación del citocromo c mitocondrial en B-CLLs.

- 60 Se aislaron células leucémicas procedentes de la sangre periférica de pacientes con B-CLL por centrifugación a través de Ficoll-Hypaque y se cultivaron durante los tiempos indicados con o sin oligodesoxinucleótidos de fosforotioato no codificantes de BAG3 o sin sentido control (5  $\mu$ M) descritos en el texto. A continuación se obtuvieron extractos celulares y se analizó la liberación del citocromo c mitocondrial según la referencia 8.

Figura 4 - Efecto de oligodesoxinucleótidos no codificantes dirigidos contra BAG3 sobre la actividad caspasa 3 en B-CLLs.

Se aislaron células leucémicas procedentes de la sangre periférica de pacientes con B-CLL por centrifugación a través de Ficoll-Hypaque y se cultivaron durante los tiempos indicados con o sin oligodesoxinucleótidos de fosforotioato no codificantes de BAG3 o sin sentido control (5 µM) descritos en el texto. A continuación se obtuvieron extractos celulares y se analizó la actividad de la caspasa 3 según la referencia 9.

Figura 5 - Efecto de oligodesoxinucleótidos no codificantes dirigidos contra BAG3 sobre la unión de la anexina V en B-CLLs.

Se aislaron células leucémicas procedentes de la sangre periférica de pacientes con B-CLL por centrifugación a través de Ficoll-Hypaque y se cultivaron durante el tiempo indicado de 40 h con o sin oligodesoxinucleótidos de fosforotioato no codificantes de BAG3 o sin sentido control (5 µM) descritos en el texto. A continuación se analizó la vitalidad celular mediante la incorporación de yoduro de propidio en células no permeabilizadas, mientras que al mismo tiempo se analizaba por inmunofluorescencia la unión de anexina V según la referencia 10. A: porcentajes de células vivas, células apoptóticas y células muertas en las regiones del citograma; B: PI frente a la tinción de la anexina V.

Figura 6 - Efecto de oligonucleótidos no codificantes dirigidos contra BAG3 sobre la apoptosis en 15 especímenes con B-CLL.

Se aislaron células leucémicas procedentes de la sangre periférica de pacientes con B-CLL por centrifugación a través de Ficoll-Hypaque y se cultivaron durante 5 días con o sin fosfato de fludarabina (2 µg/ml) y/o los oligodesoxinucleótidos de fosforotioato no codificantes de BAG3 o sin sentido control (5 µM) descritos en el texto. A continuación se analizó la apoptosis de las células mediante permeabilización celular y tinción con PI según la referencia 11.

Figura 7 - Efecto de oligodesoxinucleótidos no codificantes dirigidos contra BAG3 sobre la apoptosis celular de ALL.

Se aislaron células leucémicas procedentes de la sangre periférica de pacientes con ALL por centrifugación a través de Ficoll-Hypaque y se cultivaron durante 4 días (panel A) o los tiempos indicados (panel B) con o sin arabinósido de citosina (AraC, 1 µM) y/o los oligodesoxinucleótidos de fosforotioato no codificantes de BAG3 o sin sentido control (5 µM) descritos en el texto. A continuación se analizó la apoptosis de las células mediante permeabilización celular y tinción con PI según la referencia 11.

Tabla 1 - Efecto de oligodesoxinucleótidos no codificantes dirigidos contra BAG3 sobre la apoptosis en células de la línea SAOS de osteosarcoma humano

Oligo	Incubación		
	Medio Control	Etopósido (5 µM)	Topotecan (40 ng/ml)
	17,74*	38,32	36,84
no codificante BAG3	52,38	73,40	68,62
sin sentido control	25,84	45,40	41,60

\*% de apoptosis

Se incubaron células de la línea SAOS durante 72 horas en 10% FCS-RPMI con o sin compuestos quimioterapéuticos (etopósido o topotecan) y/o los oligodesoxinucleótidos de fosforotioato no codificantes de BAG3 o sin sentido control (5 µM) descritos en el texto. A continuación se analizó la apoptosis de las células mediante permeabilización celular y tinción con PI según la referencia 11.

Figura 8 - Efecto de oligodesoxinucleótidos no codificantes dirigidos contra BAG3 sobre los niveles de la proteína BAG3 en células de la línea de leucemia mieloide humana U937.

Se cultivaron células U937 durante 24 horas en 10% FCS-RPMI con o sin los oligodesoxinucleótidos de fosforotioato no codificantes de BAG3 o sin sentido control (5 µM) descritos en el texto. A continuación las células se permeabilizaron y se analizaron por inmunofluorescencia indirecta con AC-BAG3-1.

Figura 9 - Efecto de oligodesoxinucleótidos no codificantes dirigidos contra BAG3 sobre la apoptosis inducida por

estrés en células de la línea de leucemia mieloide humana U937.

Se cultivaron células U937 durante 40 horas con o sin maleato de dietilo (DEM, 1,2  $\mu$ M) y/o los oligodesoxinucleótidos de fosforotioato no codificantes de BAG3 o sin sentido control (5  $\mu$ M) descritos en el texto. A continuación se analizó la apoptosis de las células mediante permeabilización celular y la tinción con PI según la referencia 11.

Figura 10 - Efecto de oligodesoxinucleótidos no codificantes dirigidos contra BAG3 sobre la apoptosis inducida por estrés en leucocitos de sangre periférica humana normal.

Se obtuvieron linfocitos (panel A) y monocitos (panel B) procedentes de la sangre periférica normal de seres humanos por centrifugación a través de un gradiente de densidad del 50-72% en Ficoll-Hypaque y se cultivaron en 10% FCS-RPMI durante 48 horas con o sin una combinación de DEM (1,2  $\mu$ M) y 2ME (20  $\mu$ M) y/o los oligodesoxinucleótidos de fosforotioato no codificantes de BAG3 o sin sentido control (5  $\mu$ M) descritos en el texto. A continuación se analizó la apoptosis de las células mediante permeabilización celular y la tinción con PI según la referencia 11.

Tabla 2 - Efecto protector de la hiperexpresión de BAG3 sobre la apoptosis inducida por estrés en la línea celular humana 293.

Construcción transfectada	Incubación	% de apoptosis
pcADN control	Medio control	6,1 $\pm$ 0,3*
	DEM + 2ME	32,4 $\pm$ 1,2
pcADN de BAG3	Medio control	5,3 $\pm$ 0,2
	DEM + 2ME	13,4 $\pm$ 0,5

\*media de los duplicados  $\pm$  DE

Se transfectaron células de la línea humana 293 usando una preparación Fugene (Roche) con una construcción de pcADN que el hiperexpresa BAG3 o un pcADN control vacío. La hiperexpresión de la proteína BAG3 se verificó mediante inmunofluorescencia. A continuación las células se incubaron durante 48 horas en 10% FCS-RPMI con o sin una combinación de DEM+2ME y se analizó la apoptosis mediante permeabilización celular y tinción con PI según la referencia 11.

Tabla 3 - La expresión de BAG3 influye en el crecimiento de células neoplásicas humanas (osteosarcoma) xenoinjertadas en ratones sin pelo

Se inyectaron células de osteosarcoma humano de la línea SAOS ( $10 \times 10^6$ ), de tipo silvestre (A) o transfectadas de manera estable con un vector que hiperexpresa BAG3 (B) o un vector control vacío (C) en ratones nu/nu de seis semanas de edad; el volumen del tumor se midió cada semana. Se presentan los resultados finales al término de la octava semana.

# ratón		Volumen del tumor (mm <sup>3</sup> )
		<40
	B	65
	C	<40
2	A	<40
	B	45
	C	<40
3	A	<40
	B	0,92
	C	<40
4	A	<40
	B	<40
	C	<40
5	A	<40
	B	65
	C	<40

Figura 11 -Expresión de la proteína BAG3 en células ALL y su modulación en defecto mediante oligonucleótidos no codificantes específicos de BAG3.



A - Se cultivaron células ALL ( $1 \times 10^6$ /ml) en 10% FCS-RPMI con o sin los oligonucleótidos sin sentido control (TTATATTCTATTATATTTATGMCTCC, SEQ ID NO 12, sin sentido 1) o los oligonucleótidos no codificantes específicos de BAG3 (TGCATCATGGGCGAGTGGGTGGCGG, SEQ ID NO 9, no codificantes 1) (5  $\mu$ M) durante 24 h. A continuación se obtuvieron los lisados celulares y se analizaron por transferencia de Western con anticuerpos dirigidos contra BAG3 (AC-BAG3-1; se obtuvieron resultados análogos con AC-BAG3-2) o anticuerpos dirigidos contra tubulina. B - Se cultivaron células ALL ( $1 \times 10^6$ /ml) en 10% FCS-RPMI con o sin oligonucleótidos no codificantes específicos de BAG3 (TGCATCATGGGCGAGTGGGTGGCGG, SEQ ID NO 9, no codificantes 1) (a) u oligonucleótidos sin sentido control (TTATATTCTATTATATTTATGMCTCC, SEQ ID NO 12, sin sentido 1) (b) (5  $\mu$ M) durante 24 h. A continuación las células se analizaron por inmunofluorescencia intracelular con el anticuerpo policlonal dirigido contra BAG3. Los controles negativos con una preparación de anticuerpos de conejo control se muestran a la izquierda en a y b. Los resultados son representativos para experimentos con al menos tres muestras diferentes de ALL; se obtuvieron resultados comparables usando uno cualquiera de los tres ODN no codificantes o sin sentido.

15 Figura 12 - Efectos de los oligonucleótidos no codificantes específicos de BAG3 o de AraC sobre la apoptosis de células ALL.

A - Se cultivaron células ALL ( $1 \times 10^6$ /ml) procedentes de 10 muestras diferentes en 10% FCS-RPMI con o sin los oligonucleótidos sin sentido control u oligonucleótidos no codificantes específicos de BAG3 (5  $\mu$ M), o con AraC (10  $\mu$ M), durante 4 días. A continuación se analizó la apoptosis celular mediante la incorporación de yoduro de propidio en células permeabilizadas y citometría de flujo. Se llevó a cabo la prueba t de Student para evaluar la diferencia entre los porcentajes de apoptosis detectados en células control y células cultivadas con oligonucleótidos no codificantes de BAG3, respectivamente.

25 Tabla 4. Unión de los sobrenadantes del clon madre de hibridoma a construcciones de MAP-BAG3 como se detecta mediante la prueba de ELISA.

Prueba de ELISA de anticuerpos producidos mediante los clones madre monoclonales AC-1, AC-2, AC-3, AC-4, AC-5, AC-6, AC-7, AC-8, AC-9. Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de nueve clones madre de hibridoma (AC-1 a -9) y se analizaron para su unión a las construcciones MAP-BAG3.

	Map 1	Map 2	Map 3	Map 4	Map 1	Map 2	Map 3	Map 4	Map 1	Map 2	Map 3	Map 4
1/2	1,254	2,475	0,050	0,042	1,808	0,504	0,412	0,424	3,825	0,054	0,053	0,050
1/10	0,345	0,966	0,047	0,042	0,474	0,137	0,128	0,123	3,756	0,053	0,050	0,046
1/2	2,012	1,568	0,047	0,042	1,782	0,666	0,438	0,451	3,747	0,059	0,065	0,062
1/10	0,715	0,460	0,045	0,042	0,608	0,164	0,150	0,149	3,729	0,046	0,051	0,049
1/2	0,044	0,048	0,300	0,046	2,133	0,646	0,547	0,396	3,822	0,047	0,047	0,052
1/10	0,042	0,046	0,109	0,045	0,580	0,154	0,140	0,138	3,556	0,049	0,046	0,048

	Map 1	Map 2	Map 3	Map 4	Map 1	Map 2	Map 3	Map 4	Map 1	Map 2	Map 3	Map 4
1/2	AC-4				AC-1				AC-7			
1/10												
1/2	AC-5				AC-2				AC-8			
1/10												
1/2	AC-6				AC-3				AC-9			
1/10												

Figura 13 - Unión de anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de BAG3 a proteínas procedentes de células HeLa o células de leucemia primaria aguda.

A - Se analizaron los lisados procedentes de células HeLa o células de leucemia primaria aguda por transferencia de Western usando los anticuerpos AC-BAG3-1 (bandas centrales: 3 y 4) o AC-BAG3-2 (bandas 1, 2 y 5) (A). B - Se analizaron los sobrenadantes procedentes de los clones madre de hibridoma AC-1 (1), AC-2 (2), AC-3 (3) o AC-4 (4) para su unión a proteínas procedentes de células HeLa por transferencia de Western.

**Referencias**

1. Nicholson D W. 2000. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. Nature 407: 810.

2. Takayama S y Reed J C. 2001. Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nature Cell Biology* 3: E237.
3. Takayama T, Xie Z, y Reed J C. 1999. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* 274: 781.
4. Doong H, Price J, Kim Y-S, Gasbarre C, Probst J, Liofta L A, Blanchette J, Rizzo K, y Khon E. 2000. CAIR-1/BAG-3 forms and EGF-regulated ternary complex with phospholipase C gamma and Hsp70/Hsc70. *Oncogene* 19: 4385.
- 10 5. Lee J-H, Takahashi T, Yasuhara N, Inazawa J, Kamada S, Tsujimoto Y. 1999. Bis, a Bcl-2-binding protein that synergize with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene* 18: 6183.
6. Liao O, Ozawa F, Friess H, Zimmermann A, Takayama S, Reed J C, Kleeff J, Buchler M W. 2001. The anti-apoptotic protein BAG-3 is overexpressed in pancreatic cancer and induced by heat stress in pancreatic cancer cell lines. *FEBS Lett.* 503:151.
- 15 7. Antoku K, Maser R S, Scully W J Jr, Delach S M, y Johnson D E. 2001. Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and Suppressor of Death Domains protein. *Biochem Biophys Res Comm* 286: 1003.
- 20 8. Renz A, Berdel W E, Kreuter M, Belka C, Schulze-Osthoff K, Los M. 2001. Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and marks cell death *in vivo*. *Blood* 98:1542.
9. Kluck R M, Martin S J, Hoffman B M, Zhou J S, Green D R y Newmeyer D D. 1997. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J.* 16: 4639.
- 25 10. Koopman G, Reutelingsperger C P, Kuijten G A, Keehnen R M, Pals S T, van Oers M H. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 84:1415.
11. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C, Grignani F, Riccardi C A. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271.
- 30 12. Tassone P, Tuccillo F, Bonelli P, Turco M C, Cecco L, Cerra M, Bond H M, Barbieri V, Venuta S. 1998. CD36 is rapidly and transiently upregulated on phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheralblood lymphocytes. Analysis by a new monoclonal antibody (UN7). *Tissue Antigens* 51: 671.
- 35 13. Romano M F, Lamberti A, Tassone P, Alfinito F, Costantini S, Chiurazzi F, Defrance T, Bonelli P, Tuccillo F, Turco M C, Venuta S. 1998. Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B-CLL cells. *Blood* 92: 990.
- 40 14. Manolagas S C. 2001. Manipulating programmed cell death for better living. *Sci STRKE* 19: 87.
15. Drissi R, Zindy F, Roussel M F, Cleveland J L. c-Myc-mediated regulation of telomerase activity is disabled in immortalized cells. 2001. *J Biol Chem* 276: 29994.
- 45 16. Petit-Frere C, Capulas E, Lyon D A, Norbury C J, Lowe J E, Clingen P H, Riballo E, Green M H, Arlett C F. 2000. Apoptosis and cytokine release induced by ionizing or ultraviolet B radiation in primary and immortalized human keratinocytes. *Carcinogenesis* 21: 1087.
17. Brezden C B, Rauth A M. 1996. Differential cell death in immortalized and non-immortalized cells at confluency. *Oncogene* 12: 201.
- 50 18. Iordanov M S, Wong J, Newton D L, Rybak S M, Bright R K, Flavell R A, Davis R J, Magun B E. 2000. Differential requirement for the stress-activated protein kinase/c-Jun NH(2)-terminal kinase in RNAdamage-induced apoptosis in primary and in immortalized fibroblasts. *Mol Cell Biol Res Commun* 4:122.
- 55 19. Marsden V S, Strasser A. 2000. Control of Apoptosis in the Immune System: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More. *Annu Rev Immunol* 16 de Octubre 2002.
- 60 20. Roth W, Grimm C, Rieger L, Strik H, Takayama S, Krajewski S, Meyermann R, Dichgans J, Reed J C, Weller M. 2000. Bag-1 and Bcl-2 gene transfer in malignant glioma: modulation of cell cycle regulation and apoptosis. *Brain Pathol.* 10: 223.

21. Zong W X, Lindsten T, Ross A J, MacGregor G R, Thompson C B. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15:1481.
22. Gewirtz A M. 1999. Oligonucleotide therapeutics: clothing the emperor. *Curr Opin Mol Ther* 3: 297.
23. Opalinska J B, Gewirtz A M. 2002. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat Rev Drug Discov* 7: 503.
24. Keah H H, Kecorius E, Hearn M T. 1988. Direct synthesis and characterisation of multi-dendritic peptides for use as immunogens. *J Pept Res* 51: 2.
25. Tam J P. 1988. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5409.
26. Ota S, Ono T, Morita A, Uenaka A, Harada M, Nakayama E. 2002. Cellular processing of a multibranch lysine core with tumor antigen peptides and presentation of peptide epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes on antigen-presenting cells. *Cancer Res* 62:1471.

**Listado de secuencias**

- <110> LEONE Arturo et al
- <120> SECUENCIAS DEL NUCLEÓTIDO Y LA PROTEÍNA BAG3 PARA SU USO EN INVESTIGACIÓN, DIAGNOSIS Y TERAPIA DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA MUERTE CELULAR, Y PARA LA MODULACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y/O MUERTE CELULAR
- <130> 3135PTWO
- <150> EP 01830834.6
- <151> 2001-12-28
- <160> 18

30 Secuencia de nucleótidos de BAG3 (SEQ ID NO: 1):  
Referencia: NCBI PubMed, XM 055575  
atanogen 3 asociado a BCL2 de *Homo sapiens* (BAG3), ARNm  
gi|16156810|ref|XM — 055575.1[[16156810]

35 1 gcggagctcc gcatccaacc ccgggccgcg gccaaacttt ttggactgga ccagaagttt  
61 ctagccggcc agttgctacc tccctttatc tctccttcc cctctggcag cgaggaggct  
121 atttccagac acttccacc ctctctggcc acgtcaccce cgcctttaat tcataaaggt  
181 gcccggcgcc ggttcccgq acacgtcggc ggcggagagg gccccacggc ggcggcccgg  
241 ccagagactc ggcgcccga gccagcggcc cgcacccgcg ccccagcggg cagaccccaa  
301 cccagcatga gcgcccacc cactcggcc atgatgcagg tggcgtccgg caacggtgac  
361 cgcgaccctt tgcccccg atgggagatc aagatcgacc cgcagaccgg ctggcccttc  
421 ttcgtggacc acaacagcc caccactacg tggaaagacc cgcgctgccc ctctgagggc  
481 cccaaggaga ctccatcctc tqccaatggc ccttcccggg agggctctag gctgcccct  
541 gctaggggag gccaccctgt gtacccccag ctccgaccag gctacattcc cattcctgtg  
601 ctccatgaaq gcgctgagaa ccggcaggtg caccctttcc atgtctatcc ccagcctggg  
661 atgcagcgat tccgaactga ggcggcagca gcggctcctc agaggtccca gtcacctctg  
721 cggggcatgc cagaaaccac tcagccagat aaacaagtat gacaggtggc agcggccggc  
781 gcagcccagc cccagcctc ccacggacct gacgggtccc agtctccagc tgctctgac  
841 tgctcatcct cctcctcctc gcccagcctg ccttccctccg gcaggagcag cctgggcagt  
901 caccagctcc cgcgggggta catctccatt ccggtgatac acgagcagaa cgttaccggg  
961 ccagcagccc agcctcctt ccaccaagcc cagaagacgc actaccagc gcagcagggg  
1021 gagtaccaga cccaccagcc tgtgtaccac aagatccagg gggatgactg ggagccccgg  
1081 cccctgcccg cggcatcccc gttcaggtca tctgtccagg gtgcatcgag ccgggagggc

1141 tcaccagcca ggagcagcac gccactccac tccccctcgc ccatccgtgt gcacaccgtg  
 1200 gtcgacaggg ctgacagcc catgacccat cgagaaactg cacctgtttc ccagcctgaa  
 1261 aacaaaccag aaagtaagcc aggcccaqtt ggaccagaac tccctcctgg acacatccca  
 1321 attcaagtga tccgcaaaga ggtggattct aaacctgttt cccagaagcc cccacctccc  
 5 1381 tctgagaagg tagaggtgaa agttccccct gctccagttc cttgtcctcc tcccagccct  
 1441 ggcccttctg ctgtccccc tcccccaag agtgtggcta cagaagagag ggcagccccc  
 1501 agcactgccc ctgcagaagc tacacctcca aaaccaggag aagccgaggc tccccaaaa  
 1561 catccagggag tgctgaaagt ggaagccatc ctggagaagg tgcaggggct ggagcaggct  
 10 1621 gtagacaact ttgaaggcaa gaagactgac aaaaagtacc tgatgatcga agagtatttg  
 1681 accaaagagc tgctggccct ggattcagtg gaccccaggg gacgagccga tgtgcgtcag  
 1741 gccaggagag acggtgtcag gaaggttcag accatcttgg aaaaacttga acagaaagcc  
 1801 attgatgtcc caqgtcaagt ccaggtctat gaactccagc ccagcaacct tgaagcagat  
 15 1861 cagccactgc aggcaatcat ggagatgggt gccgtggcag cagacaaggg caagaaaaat  
 1921 gctggaaatg cagaagatcc ccacacagaa acccagcagc cagaagccac agcagcagcg  
 1981 acttcaaacc ccagcagcat gacagacacc cctggtaacc cagcagcacc gtagcctctg  
 20 2041 ccctgtaaaa atcagactcg gaaccgatgt gtgcttttagg gaattttaag ttgcatgcat  
 2101 ttcagagact ttaagtcaqt tggttttat tagctgcttg gtatgcagta acttgggtgg  
 2161 aggcaaaaca ctaataaaag ggctaaaaag gaaaatgatg cttttcttct atattcttac  
 2221 tctgtacaaa taaagaagt gcttgttgtt tcagaagttt aaccccqttg cttgttctgc  
 25 2281 agccctgtct acttgggcac ccccaccacc tgttagctgt gtttgtgcac tgtcttttq  
 2341 agctctggac tggaggggta gatggggagt caattacca tcacataaat atgaaacatt  
 2401 tatcagaaat gttgccattt taatgagatg attttcttca tctcataatt aaaatacctg  
 30 2461 actttagaga gactaaaatg tgccagagc cataggaata tctgtatggt gqatgacttt  
 2521 aatgctacat ttt

Secuencia de aminoácidos de BAG3 (SEQ ID NO: 2):  
 Referencia: NCBI PubMed, XM 055575  
 atanogen 3 asociado a BCL2 de *Homo sapiens* (BAG3), ARNm  
 35 gj|16156810|ref|XM - 055575.1|[16156810]

**MSAATHSPMMOVASGNDRDPLPPGWEIKIDPOTGWPFVVDHNS**  
**RTTTWNDPRVPSEGPKEPSSANGPSREGSRLPPAREGHPVYPOLRPGYIPIPVLHEG**  
 40 **AENROVHPFHVYPOPGMORFRTEAAAAAPORSOSPLRGMPEETTOPDKOCGOVAAAAAA**  
**OPFASHGPERSOSPAAASDCSSSSSSASLPSSGRSSLGSHOLPRGYISIPVIHEONVTR**  
**PAAOPSFHOAOKTHYPAOOGYOTHOPVYHKIOGDDWEPRPLRAASPFRSSVOGASSR**  
**EGSPARSSTPLHSPSPIRVHTVVDROOPMTHRETAPVSOPENKPEKPGVGPVPELPP**  
 45 **GHIPIQVIRKEVDSKPVSKPPPPSEKVEVKVPPAPVPCPPSPGPSAVPSSPKSVAT**  
**EERAAPSTAPAEATPPKPGEAEPKHPGVLKVEAILEKVOGLEQAVDNFEGKKTDKK**  
**YLMIEEYLTKELLALDSVDPEGRADVRRQARRDGVKQVQITILEKLEQKVIDVPGQVQVY**  
 50 **ELOPSNLEADOPLOAIMEMGAVAADKGGKKNAGNAEDPHTETOPEATAAATSNPSSMT**  
**DTPGNPAAP**

SEQ ID NO: 3:

55 gcgagctcc gcatccaacc ccgggccgcg gccactttt ttggactgga ccagaagttt  
 ctagecggcc agttgtacc tccctttatc tctccttc cctctggcag cgaggaggct  
 atttcagac acttccacc ctctctggcc acgtcacc cgcctttaat tcataaaggt  
 gccggcgcc ggcttcccgg acacgtcggc ggcggagagg ggcccacggc ggccggcccg  
 60 ccagagactc ggcgcccga gccagcggc cgcaccgcg cccagcggg cagacccaa  
 cccagcatga gcgcccacc cactcggccc atgatgcagg tggcgtccgg caacggtgac

**SEQ ID NO: 4:**

MSAATHSPMMQVASGNGDRDPLPPGWEIKIDPQTG

**SEQ ID NO: 5:**

5 gtgcc ctctgagggc cccaaggaga ctccatcctc tgccaatggc cttcccggg agggctctag  
 gctgccgcct gctaggggaag gccaccctgt gtacccccag ctccgaccag gctacattcc  
 cattcctgtg ctccatgaag gcgctgagaa cgggcaggtg caccctttcc atgtctatcc  
 10 ccagcctggg atgcagcgat tccgaactga ggcggcagca gcggctcctc agaggtccca  
 gtcacctctg cggggcatgc cagaaaccac tcagccagat aacagtggtg gacaggtggc  
 agcggcggcg gcagcccagc ccccagcctc ccacggacct gagcgggtccc agtctccagc  
 tgctctgac tgctcatcct catcctcctc ggccagcctg cttcctccg gcaggagcag  
 15 cctgggcagt caccagctcc cgcgggggta catctccatt ccggtgatac acgagcagaa  
 cgttaccctgg ccagcagccc agccctcctt ccaccaagcc cagaagacgc actaccagc  
 gcagcagggg gagtaccaga cccaccagcc tgtgtaccac aagatccagg gggatgactg  
 ggagccccgg cccctgcggg cggcatcccc gttcaggtca tctgtccagg gtgcatcgag  
 20 ccgggagggc tcaccagcca ggagcagcac gccactccac tccccctcgc ccatccgtgt  
 gcacaccgtg gtcgacaggc ctgagcagcc catgacctat cgagaaactg cacctgtttc  
 ccagcctgaa aacaaaccag aaagtaagcc aggccagtt ggaccagaac tccctcctgg  
 25 acacatccca attcaagtga tccgaaaga ggtggattct aaacctggtt cccagaagcc  
 cccacctccc tctgagaagg tagaggtgaa agttccccct gctccagttc cttgtcctcc  
 tcccagcctt ggccttctg ctgtcccctc ttcccccaag agtgtggcta cagaagagag  
 ggcagcccc agcactgccc ctgcagaagc tacacctcca aaaccaggag aagccgaggg  
 30 tcccccaaaa catccaggag

**SEQ ID NO: 6:**

NDPRVPSGPKETPSSANGPSREGSRLPPAREGHPVYPQLRPGYIPI PVLHEGAENRQVHPFHVYPQPGMORF  
 35 RTEAAAAAPQRSQSPLRGMPE TTQPKQCGQVAAAAAQQPASHGPERSQSPAASDCSSSSSSASLPSSGRSS  
 LGSHQLPRGYISIPVIHEQNVTRPAAQPSFHQAQKTHYPAQQGEYQTHQPVYHKIQGDDWEPRPLRAASPFRS  
 SVQGASSREGSPARSSTPLHSPSPIRVHTTVVDRPQQPMTHRETAPVSQPENKPESKPGVPGLPPGHIPIQV  
 40 IRKEVDSKPVSKPPPPSEKVEVKVPPAPVPCPPSPGPSAVPSSPKSVATEERAAPSTAPAEATPPKPGAE  
 APPKHPGVLKVEAILEKVQGLEQAVDNFEG

**SEQ ID NO: 7**

45 attgatgtcc caggtcaagt ccaggtctat gaactccagc ccagcaacct tgaagcagat  
 cagccactgc aggcaatcat ggagatgggt gccgtggcag cagacaaggg caagaaaaat  
 gctggaaatg cagaagatcc ccacacagaa acccagcagc cagaagccac agcagcagcg  
 acttcaaacc ccagcagcat gacagacacc cctggtaacc cagcagcacc gtagcctctg  
 50 cctgtaaaa atcagactcg gaaccgatgt gtgcttagg gaattttaag ttgcatgcat  
 ttcagagact ttaagtcagt tggttttat tagctgcttg gtatgcagta acttgggtgg  
 aggcaaaaca ctaataaaag ggctaaaaag gaaaatgatg cttttcttct atattcttac  
 tctgtacaaa taaagaagtt gcttgttggt tcagaagttt aaccccgttg cttgtttctg  
 55 agccctgtct acttgggcac ccccaccacc tgtagctgt ggttgtgcac tgtctttgt  
 agctctggac tggaggggta gatggggagt caattacca tcacataaat atgaaacatt  
 tatcagaaat gttgccattt taatgagatg attttcttca tctcataatt aaaatactg  
 acttttagaga gagtaaaatg tgccaggagc cataggaata tctgtatggt ggatgacttt  
 60 aatgctacat ttt

**SEQ ID NO: 8:**

ELQPSNLEADQPLQAIMEMGAVAADKGKKNAGNAEDPHTETQQPEATAAATSNPSSMTDTPGNPAAP

**SEQ ID NO: 9:** TGCATCATGG GCGAGTGGGT GGCGG

5

**SEQ ID NO: 10:** GCTCATGCTG GGTTGGGGTC TG

**SEQ ID NO: 11:** ATTAAAGGCG GGGGTGACGT GG

10 **SEQ ID NO: 12:** TTATATTCTATTATATTTATGAACTCC

**SEQ ID NO: 13:** CCTCGTAACCACCG ACCTCAAT

**SEQ ID NO: 14:** GCTTATGGAG GATTGAGGTT GG

15

**SEQ ID NO 15:** DRDPLPPGWEIKIDPQ;

**SEQ ID NO 16:** SSPKSVATEERAAPS;

20 **SEQ ID NO 17:** DKGKKNAGNAEDPHT;

**SEQ ID NO 18:** NPSSMTDTPGNPAAP

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo AC-1 secretado por el clon madre de hibridoma nº PD02009 depositado el 17/12/2002 en el Centro Biotecnologie Avanzate, Génova, caracterizado porque es un anticuerpo específico para al menos una secuencia peptídica de una proteína BAG-3 humana seleccionada del grupo constituido por: SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18.
2. Un clon madre de hibridoma nº PD02009 depositado el 17/12/2002 en el Centro Biotecnologie Avanzate de Génova para la producción del anticuerpo según la reivindicación 1.
- 10 3. Un procedimiento para la preparación del anticuerpo de la reivindicación 1 usando una construcción de Péptidos antigénicos múltiples (MAP) que comprende los siguientes péptidos BAG-3:
  - MAP-BAG3-1: NH2-DRDPLPPGWEIKIDPQ-MAP que contiene la SEQ ID NO 15
  - MAP-BAG3-2: NH2-SSPKSVATEERAAPS-MAP que contiene la SEQ ID NO 16
  - MAP-BAG3-3: NH2-DKGKKNAGNAEDPHT-MAP que contiene la SEQ ID NO 17
  - 15 - MAP-BAG3-4: NH2-NPSSMTDTPGNPAAP-MAP que contiene la SEQ ID NO 18.
4. Composición que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1.
5. Un agente diagnóstico que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 para la detección de la expresión de 20 BAG-3 en células primarias.
6. Kit para la detección de la expresión de BAG-3 en células primarias que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1.

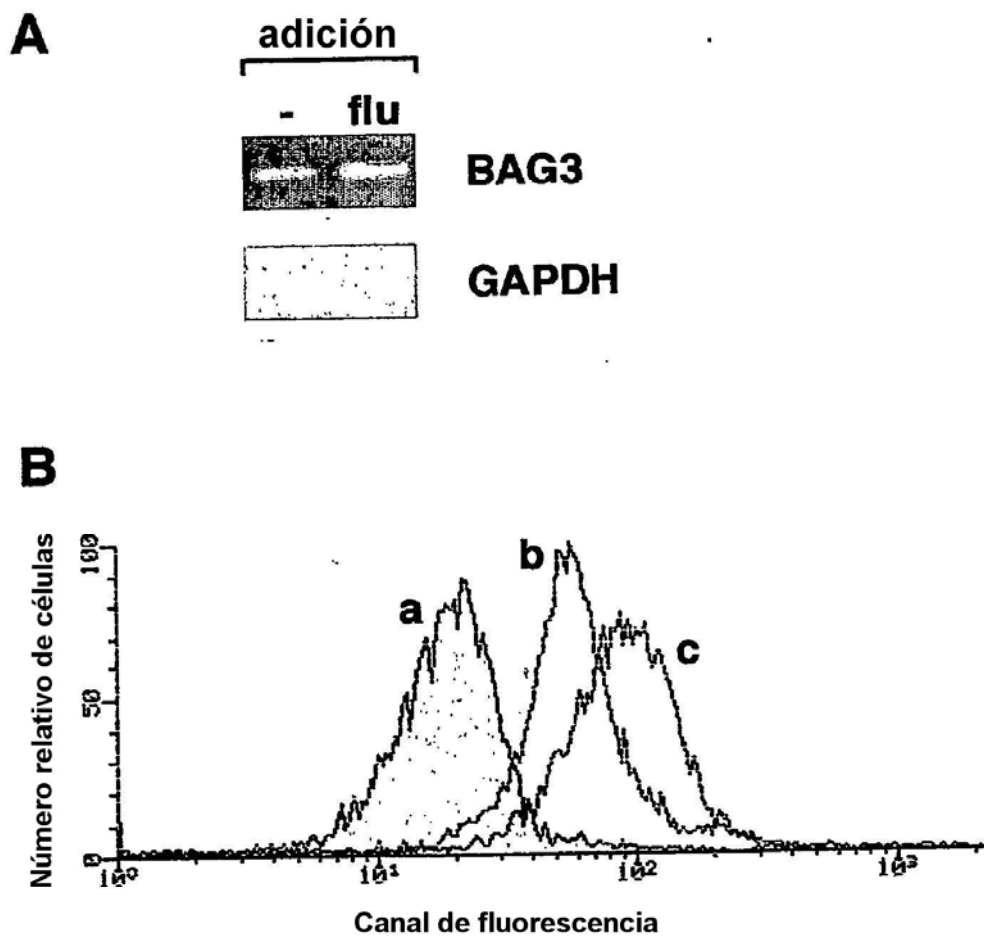


FIGURA 1



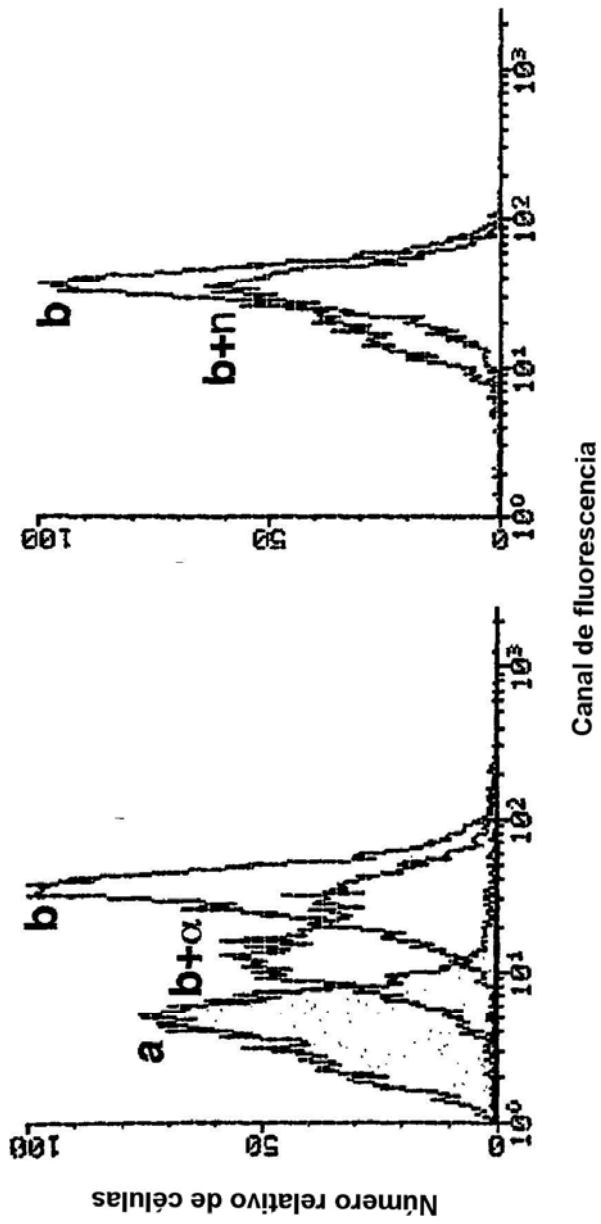


FIGURA 2

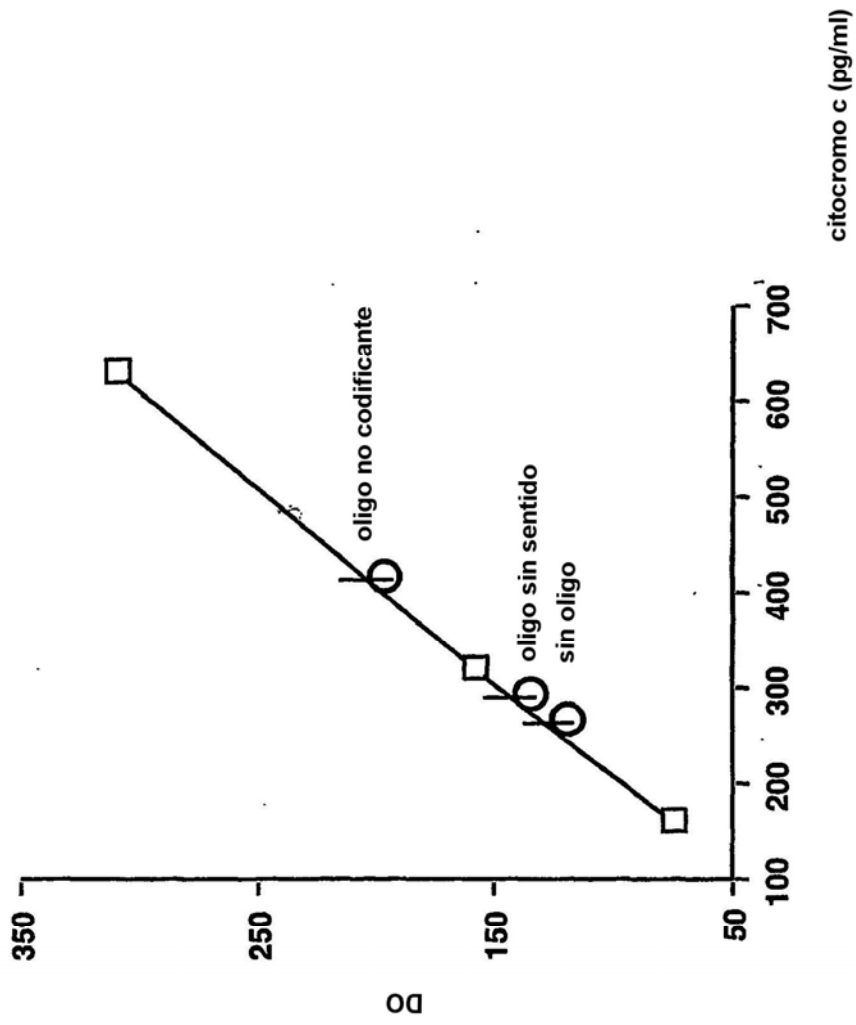


FIGURA 3

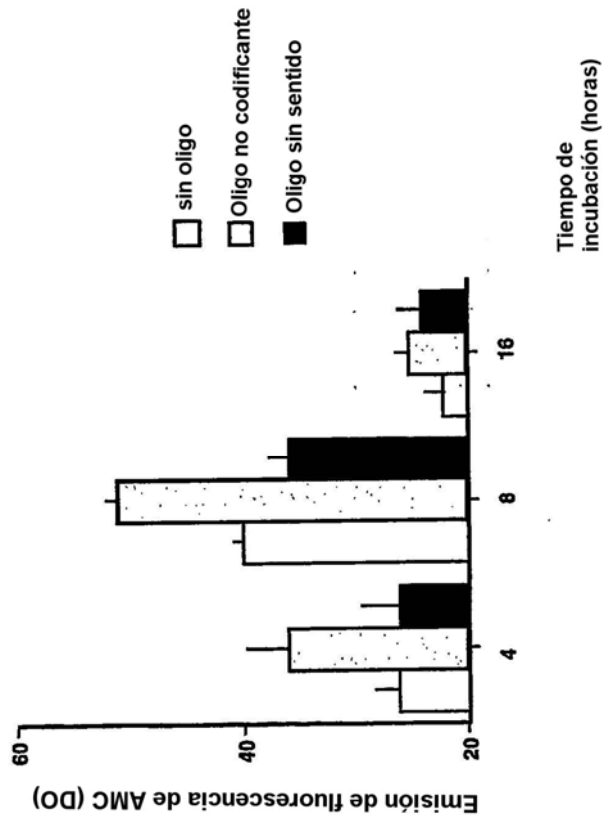
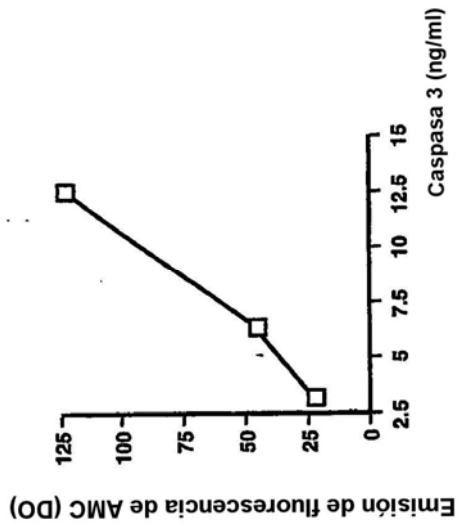


FIGURA 4

Tiempo de incubación (horas)

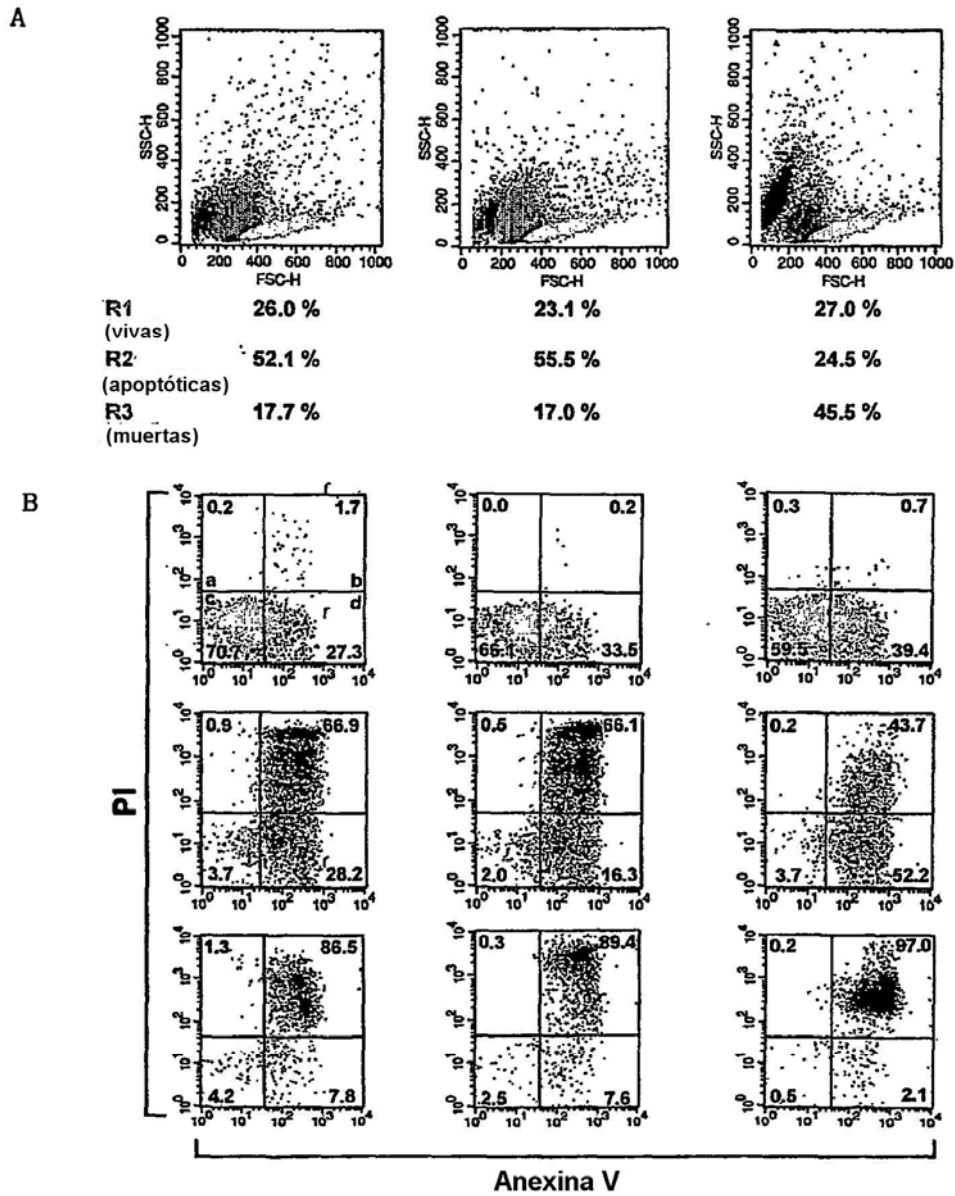


FIGURA 5

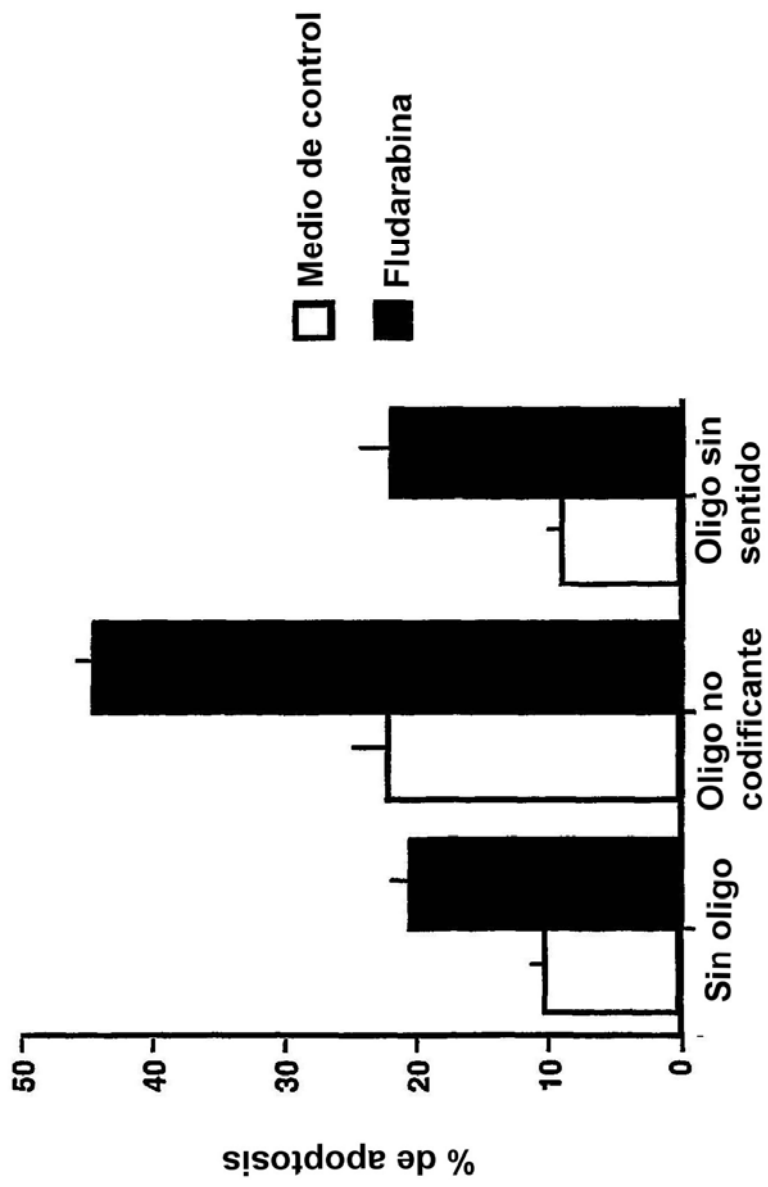


FIGURA 6

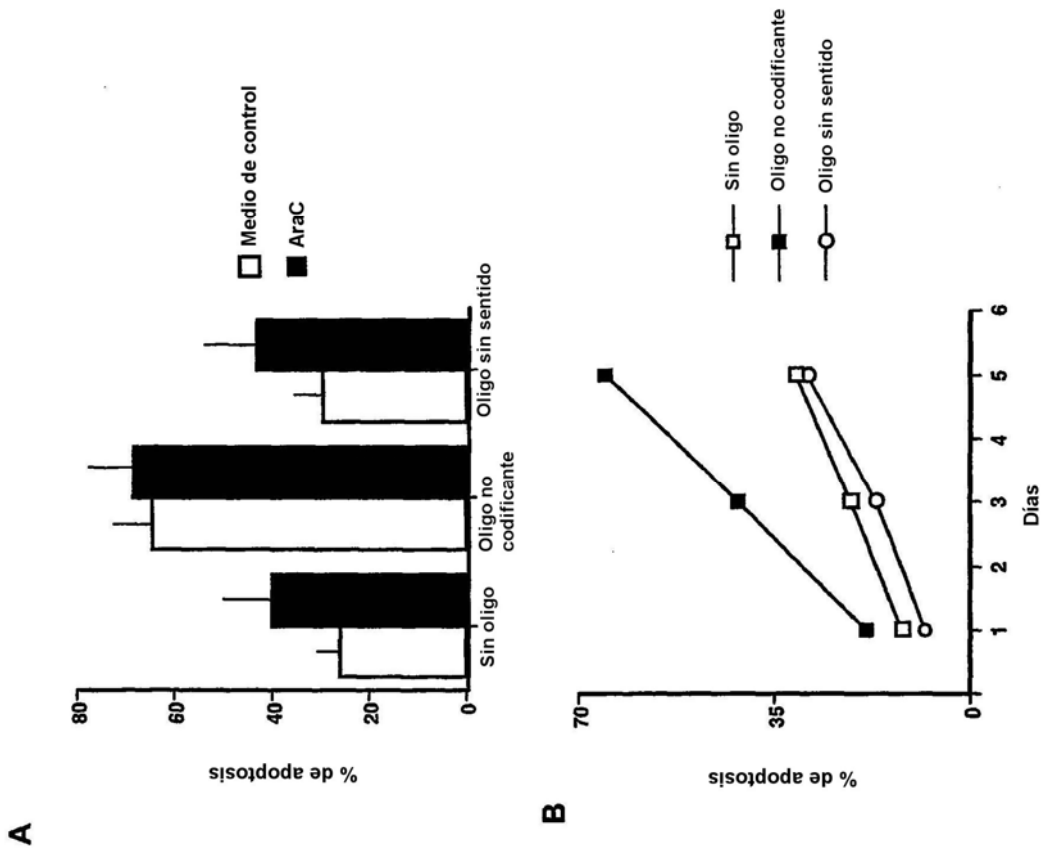


FIGURA 7

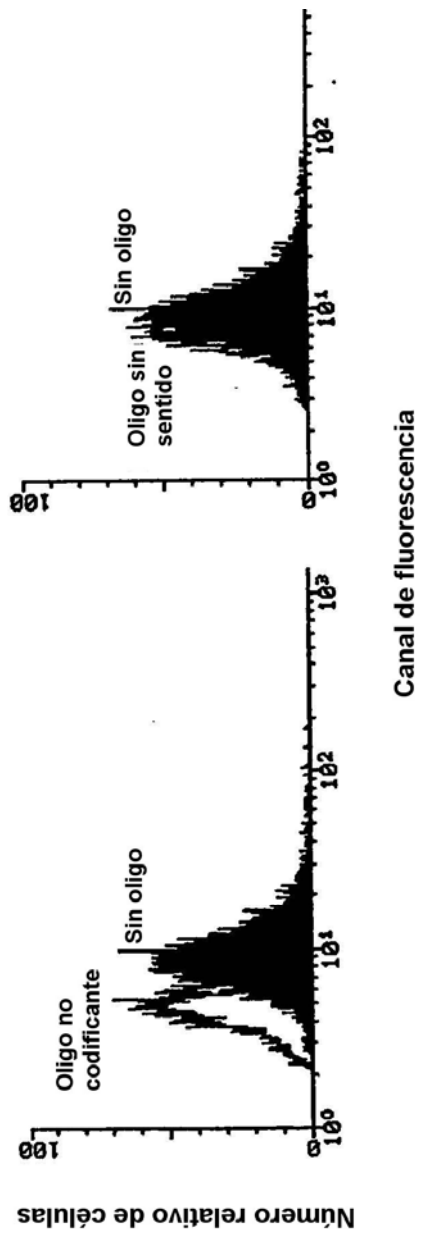


FIGURA 8

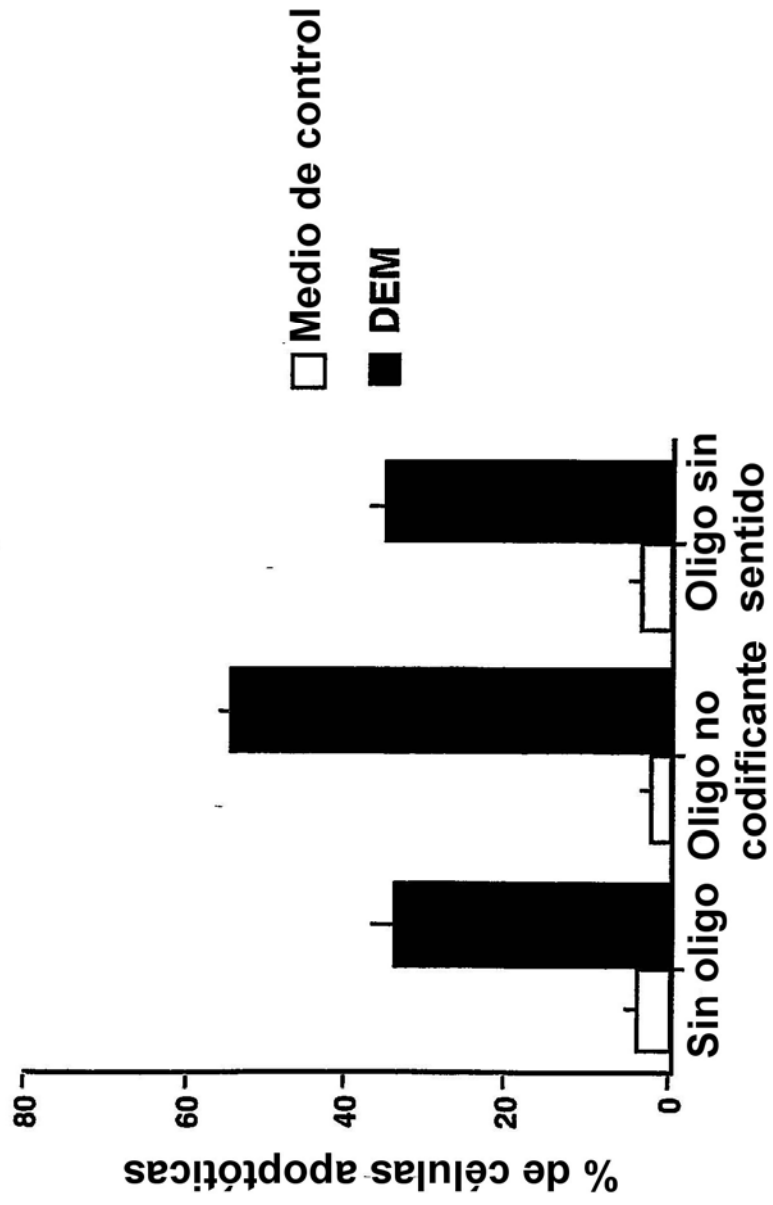


FIGURA 9



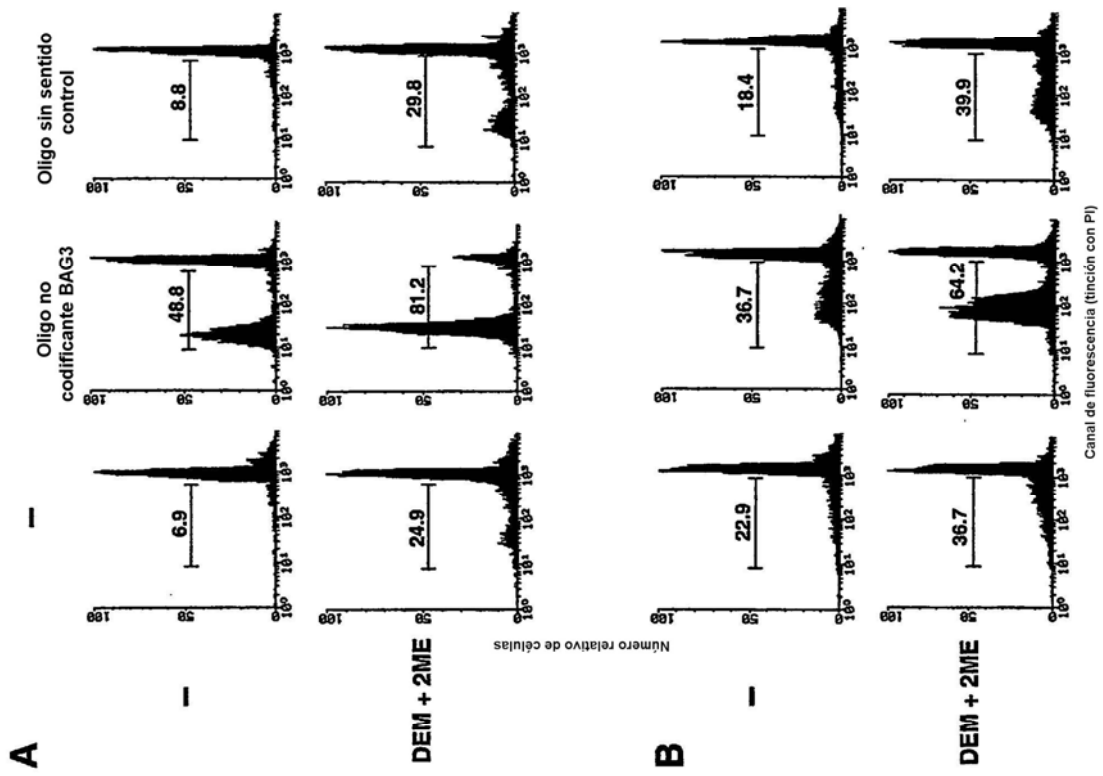


FIGURA 10

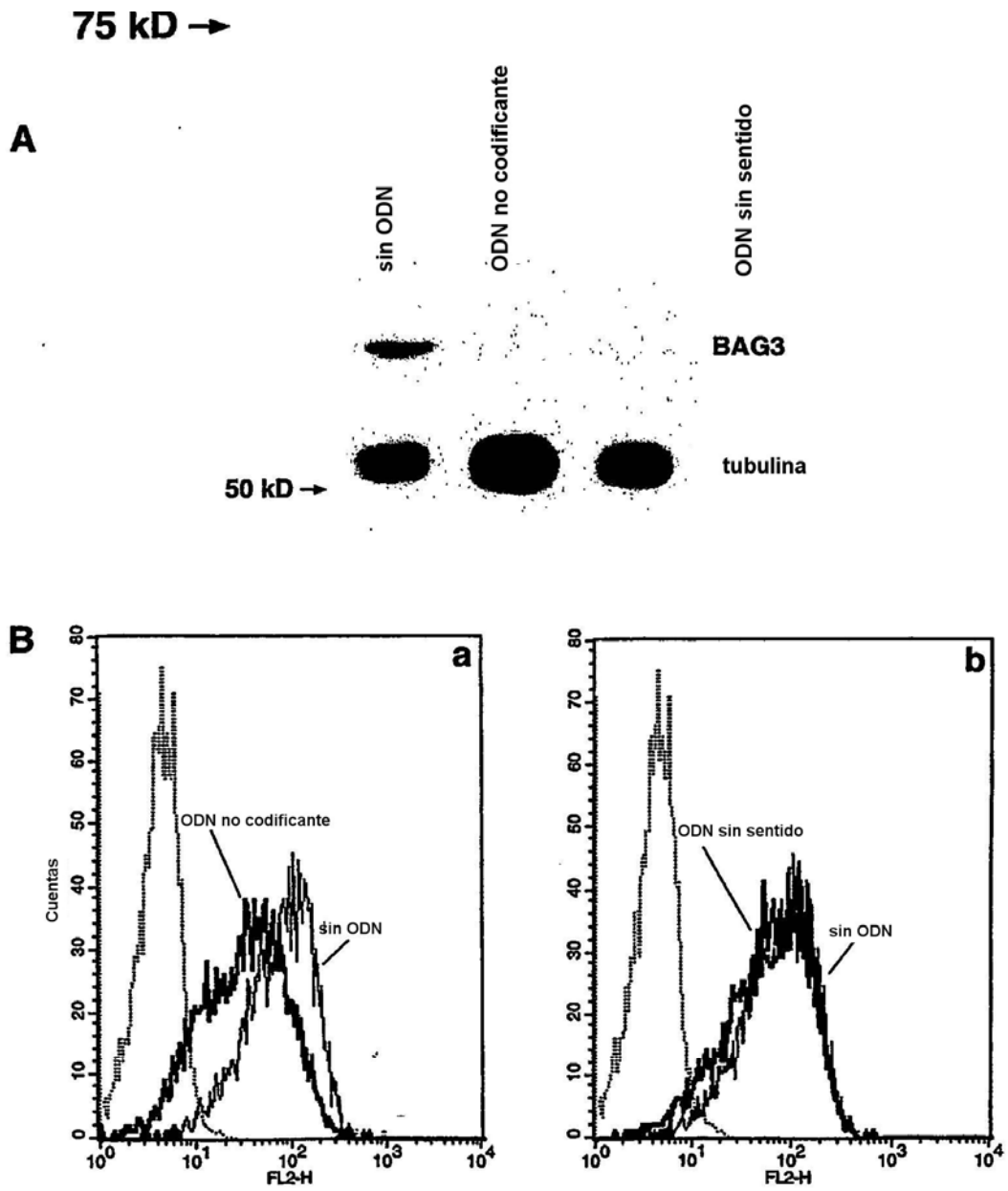


FIGURA 11

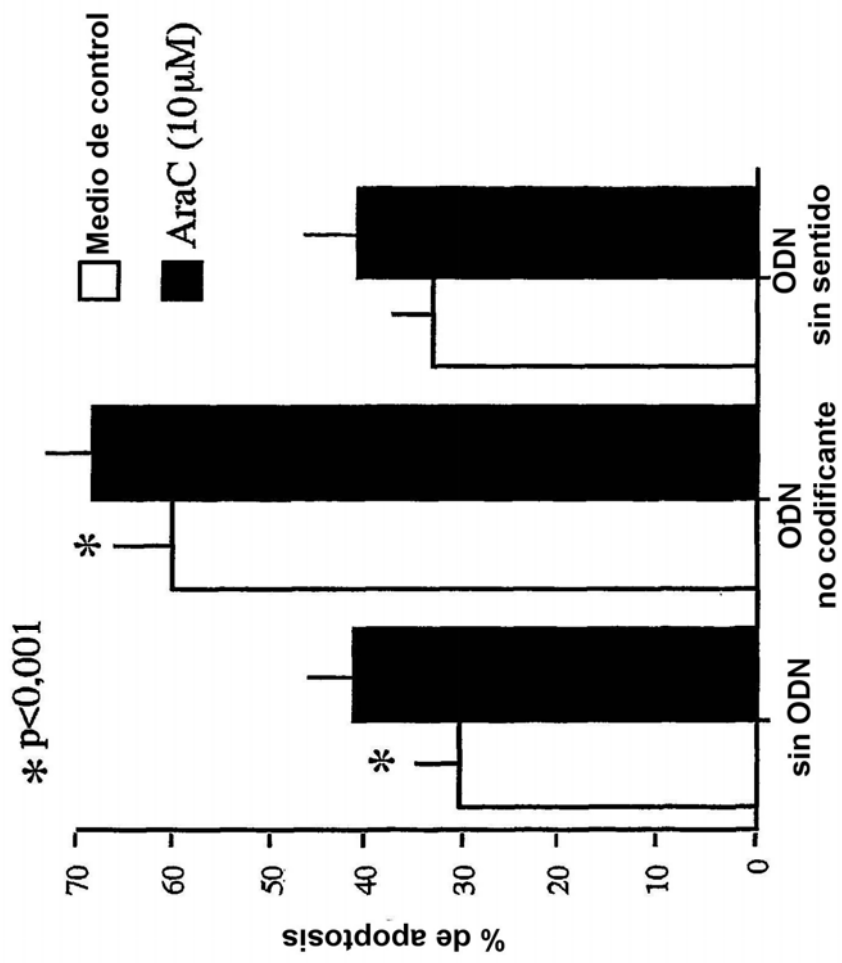


FIGURA 12

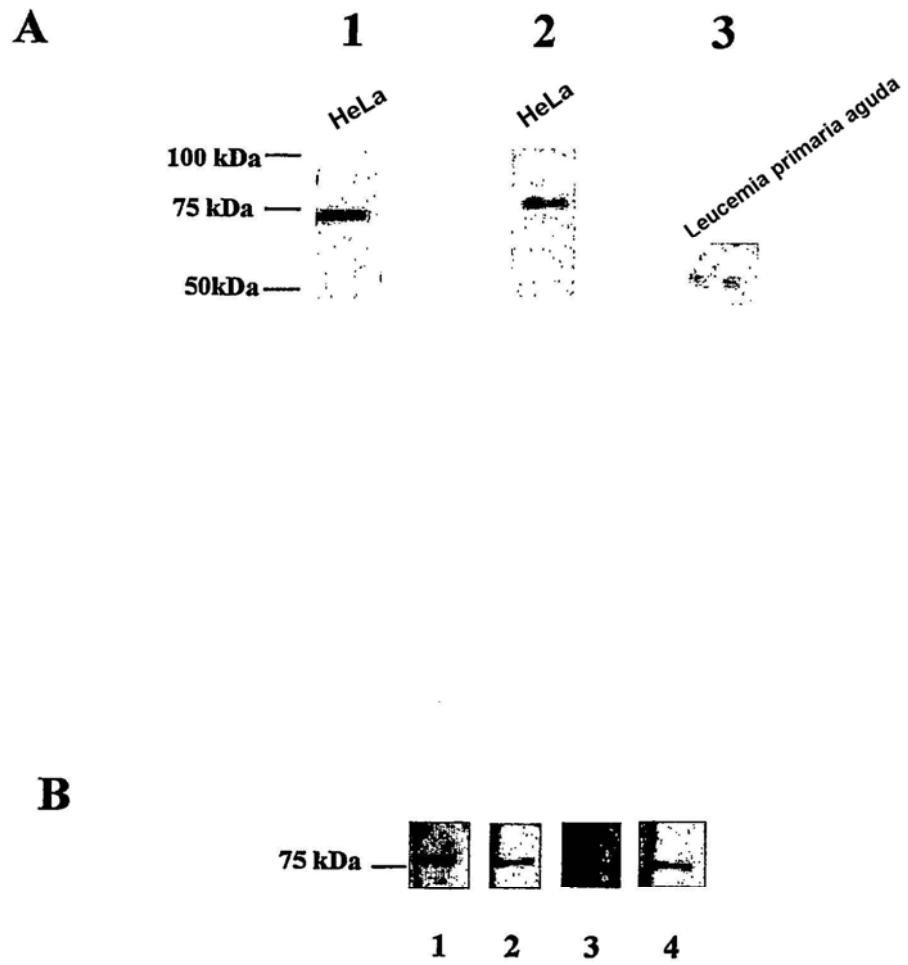


FIGURA 13