

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 734**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010 E 10805698 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2507635**

54 Título: **Biomarcador en suero bioquímico**

30 Prioridad:

04.12.2009 IT MI20092154

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2015

73 Titular/es:

**BIUNIVERSA S.R.L. (100.0%)
at Difarma Università di Salerno, Via Giovanni
Paolo II, 132
84084 Fisciano (SA), IT**

72 Inventor/es:

TURCO, MARIA CATERINA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 530 734 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

Biomarcador en suero bioquímico

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo técnico de los marcadores en suero de diagnóstico.

5 Estado de la técnica

BAG3 (Sec. de ref.: NP_004272; ID del gen 9531) es una proteína citoplasmática de 74 kDa concentrada particularmente en el retículo endoplasmático rugoso. Recientemente se ha descrito una forma citoplasmática de 40 kD que está asociada con sinaptosomas (Brown *et al.*, 2008). Además, se expresaron una forma recombinante y algunos mutantes de delección en *E. coli* (Rose *et al* 2007 (a)).

10 En seres humanos, la expresión del gen bag3 es constitutiva en miocitos, en algunos otros tipos de células normales así como en algunos cánceres (leucemias y linfomas, mieloma, cáncer pancreático y tiroideo, melanoma, osteosarcoma, etc.) (Romano *et al*, 2003; Homma *et al.* 2006; Chiappetta *et al.*, 2007, Rosati *et al.*, 2007) y se induce en diversos tipos de células en respuesta a diferentes factores de estrés: líneas de cáncer pancreático expuestas a altas temperaturas (Liao *et al.* 2001), células HeLa incubadas con metales pesados o sometidas a altas temperaturas (Pagliuca *et al.*, 2003), leucocitos tratados con maleato de dietilo, un agente inductor de estrés oxidativo (Bonelli *et al.*, 2004), células de la retina murinas dañadas por la luz (Chen *et al.*, 2004), células Molt-4 (células T leucémicas humanas) tratadas con ultrasonidos a baja intensidad (Tabuchi *et al.*, 2006), células de la microglía humanas expuestas a virus VIH-1 (Rosati *et al.*, 2007 a). Estos hallazgos indican que la regulación de la expresión de BAG3 es un componente importante en la respuesta celular al estrés y concuerda con la presencia de elementos que responden al factor de transcripción HSF (factor de choque térmico) 1, activado en diversas formas de estrés celular, en el promotor del gen bag3. La modulación de la actividad de HSF1 conduce a una reducción significativa de los niveles celulares de proteína BAG3, indicando que este regulador desempeña un papel importante en la expresión de bag3 (Franceschelli *et al.*, 2008). EGR1 es otro factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de bag3 (Gentilella *et al.*, 2008).

25 La primera evidencia de que BAG3 afecta a la supervivencia de células de cáncer primarias apareció a partir de estudios en células leucémicas primarias de 24 pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) y 11 niños con leucemia linfoblástica aguda (ALL): la disminución de los niveles de BAG3 mediante el uso de oligodesoxinucleótidos antisentido específicos dio como resultado un aumento de más del 100% de cuerpos apoptóticos ($p < 0,001$) tal como también se describe en los documentos en EP 1465927 A1 y U.S. 7.537.760 B2. Por tanto, el porcentaje de apoptosis en estas células aumentó significativamente en comparación tanto con células no tratadas como con células tratadas con los mismos fármacos quimioterápicos (Leone y Turco, 2001, Romano *et al.*, 2003a, 2003b). En leucocitos normales, se probó que la sobreexpresión del gen reducía significativamente la respuesta apoptótica (Bonelli *et al.*, 2004). Posteriormente, un análisis de tejido tiroideo de ser humano mostró que el tejido normal y muestras de bocio dieron resultados negativos en pruebas para determinar la expresión de BAG3, mientras que muestras de cáncer dieron resultados de las pruebas claramente positivos, y se observó una expresión más alta de BAG3 en tumores anaplásicos.

40 En otros tumores, tales como células de osteosarcoma y melanoma, ARNip específico de bag3 provoca una reducción de la supervivencia de células basales, lo que muestra un efecto notablemente sinérgico con agentes quimioterápicos; el silenciamiento de BAG3 en células de melanoma humanas implantadas en ratones redujo significativamente el crecimiento tumoral, con mejora de la supervivencia de animales (Ammirante *et al.*, en impresión). Por otro lado, la sobreexpresión de bag3 da como resultado una disminución de la apoptosis de células de cáncer tratadas con fármacos quimioterápicos o expuestas a otros estímulos proapoptóticos (Rose *et al.*, 2007 (b)).

45 El documento WO2011/067377 da a conocer métodos para detectar proteína BAG-3 en muestras biológicas basándose en secuencias de nucleótidos y proteínas de BAG-3 y métodos que asocian la presencia de proteína BAG-3 con estados patológicos, en particular leucemias y enfermedades que implican apoptosis.

50 Aunque se ha detectado la presencia de BAG-3 citoplasmática en diferentes sistemas de células y se ha encontrado asociada con tumores, por ejemplo leucemia o cánceres tiroideos, así como más generalmente a supervivencia celular, hasta la fecha nunca se había descrito una forma soluble de BAG3, y su presencia en el suero nunca se había asociado con estados de molestias cardíacas.

Por tanto, la presente invención soluciona el problema de la identificación de una nueva forma soluble secretada de la proteína BAG-3 y de su producción en seres humanos y otros mamíferos, que está asociada con estados patológicos específicos de manera sorprendentemente específica y sensible.

Sumario de la invención

55 La presente invención se refiere a un método para detectar la presencia y/o concentración de proteína BAG3 soluble

en una muestra biológica desconocida, que comprende las siguientes etapas:

- a. determinar la presencia o concentración de BAG3 soluble en una muestra biológica obtenida anteriormente,
- b. comparar los valores obtenidos de una muestra con valores de referencia o con valores obtenidos de muestras biológicas de referencia,
- 5 c. opcionalmente, determinar grupos adicionales de valores similares (y posiblemente su división adicional en grupos con valores medios estadísticamente diferentes),
- d. asociar la presencia y/o el nivel de BAG3 soluble a un estado patológico, en el que el estado es una cardiopatía o cáncer pancreático.

10 Preferiblemente, la etapa de dosificación (b) se realiza mediante ELISA con anticuerpos, preferiblemente monoclonales. Alternativamente, la proteína soluble puede aislarse del suero de pacientes.

El método de ensayo propuesto permite una separación estadísticamente significativa del grupo de pacientes con problemas cardiacos del grupo de gente sana, preferiblemente en grupos de edad comparable. También puede estratificar tales pacientes con cardiopatía en subgrupos de pacientes con un aumento del riesgo (insuficiencia cardiaca, IC).

15 **Descripción de las figuras**

Figura 1. Sección inmunohistoquímica que muestra la expresión de la proteína BAG3 en tejido cardiaco normal y tras la inducción de infarto en ratas.

Figura 2. Inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos anti-BAG3 realizada en lisado y sobrenadantes de cardiomiocitos.

20 Figura 3. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western, con anticuerpos anti-BAG3, de la proteína soluble purificada a partir del suero de un paciente con cardiopatía isquémica crónica.

Figura 4. Curva de calibración de ELISA para la detección de BAG3.

Figura 5. Representación gráfica de concentraciones en suero de BAG3 en donantes sanos y según grupos de edad.

25 Figura 6. Representación gráfica de concentraciones en suero de BAG3 en donantes sanos divididos en grupos de edad y en pacientes.

Figura 7. Curva ROC de la prueba ELISA para la detección de la proteína BAG3 en pacientes con insuficiencia cardiaca.

30 Figura 8. Representación gráfica de concentraciones en suero de BAG3 en pacientes con diagnóstico de insuficiencia cardiaca en comparación con pacientes con cardiopatía no descompensada.

Figura 9. a) Producción de proteína iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) y de una proteína control para comparación (GAPDH) en macrófagos murinos (J774) estimulados con dosis crecientes de BAG-3 recombinante soluble en presencia o ausencia de LPS, b) determinación de nitrito con reactivo de Griess en el mismo tipo de célula.

35 Figura 10. Análisis de microscopía confocal de la unión de proteína rBAG3 a la superficie de células J774.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se basa en el hallazgo de una forma soluble de la proteína BAG3 con una actividad biológica inesperada en comparación con la función descrita anteriormente para la forma intracelular (regulación del ciclo celular y apoptosis): por ejemplo tal forma, secretada de forma activa por las células, puede activar monocitos/macrófagos.

40 Se encontró que la forma soluble también es un marcador bioquímico en suero que es altamente específico para determinadas condiciones patológicas, especialmente cardiopatía y cáncer pancreático. Por tanto, el objeto de la presente invención es la forma soluble de la proteína BAG3 y métodos para verificar sus niveles en una muestra biológica que consiste en suero, con el fin de determinar la presencia de las situaciones patológicas mencionadas anteriormente.

45 Por BAG3 soluble se quiere decir una forma de BAG3 que se secreta de forma activa por células, tal como se muestra, por ejemplo, por su asociación con exosomas en células de cáncer pancreático (Panc-1) y por su presencia en el sobrenadante de líneas celulares de tumor viables (mediante ensayo de exclusión con azul de tripano) tales como células Hep G2 (carcinoma hepatocelular humano), células C6 (glioblastoma de rata), células ASPC-1

(adenocarcinoma pancreático humano), células ARO (carcinoma tiroideo anaplásico), células HT-29 (adenocarcinoma colorrectal) y las propias células Panc-1, mostrando así que BAG3 soluble no se origina por la liberación de contenido celular en el medio de cultivo tras la muerte celular.

5 Además, BAG3 soluble se libera (o secreta) tras la inducción de estrés oxidativo en cardiomiocitos y puede purificarse cuantitativamente como una forma con un peso molecular de alrededor de 75 kD, por ejemplo mediante SDS-PAGE, a partir del suero de pacientes con cardiopatía.

10 Por tanto, en una muestra biológica, BAG3 soluble puede distinguirse de la forma citoplasmática debido a que su presencia no depende de la presencia de células. De hecho, por ejemplo, se encuentra que la proteína BAG3 está más elevada en biopsias de tumor tiroideo que en tejido normal, pero la tinción inmunohistoquímica detecta la proteína sólo en el citoplasma.

Según el uso de BAG3 soluble como marcador en suero para un estado patológico, la invención se refiere a un método para la detección de la presencia y de la cantidad de tal forma mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales como agentes de captura y/o detección preferidos.

15 Anticuerpos anti-BAG3 monoclonales y policlonales se describen en los documentos EP 1465927 A1 y U.S. 7.537.760 B2.

Según un ejemplo, el método comprende las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra biológica, que consiste en suero o plasma, obtenida anteriormente
- b. determinar la concentración de BAG3 soluble en tal muestra biológica
- 20 c. compara los resultados obtenidos de la muestra con valores de referencia o con valores obtenidos de muestras de suero de referencia,
- d. opcionalmente, determinar subgrupos de pacientes con valores medios de BAG-3 en suero soluble que no son estadísticamente diferentes (por ejemplo, un grupo de pacientes de 21 - 43 años de edad y un grupo de 44 - 65 años de edad),
- 25 e. asociar los niveles o la presencia de BAG3 soluble con un estado patológico seleccionado entre cardiopatía o cáncer pancreático.

La definición cardiopatía se refiere a angina de pecho, angina inestable, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, enfermedad coronaria aguda, insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica y cardiopatía yatrogénica.

30 Según una realización preferida, la muestra biológica es suero o plasma y es de origen humano. También puede obtenerse de sangre completa, opcionalmente complementada con sustancias, por ejemplo con actividad anti-coagulante.

35 La presencia de BAG3 en la muestra biológica se determina preferiblemente mediante métodos inmunológicos e incluso más preferiblemente con anticuerpos monoclonales, policlonales o recombinantes anti-BAG3 (por ejemplo fragmentos ScFv, diacuerpos, etc.). Según una realización preferida, los anticuerpos son monoclonales y reconocen epítomos en la secuencia de BAG3 (Sec. de ref.: NP_004272; ID del gen 9531) incluyendo los fragmentos 18-33, 385-399 ó 533-547. Los anticuerpos son incluso más preferiblemente los identificados en el documento U.S. 7.537.760 o subclones del hibridoma parental n.º PD02009, depositado el 17/12/2002 en el Centro de biotecnología avanzada (*Advanced Biotechnology Center*) de Génova, descrito en el presente documento; alternativamente, pueden ser derivados de tales anticuerpos, tales como formas recombinantes y/o humanizadas.

40 Según una realización adicional, también pueden usarse anticuerpos anti-BAG3 comerciales (por ejemplo: anticuerpo policlonal de cabra anti-Bag3, Abcam; anticuerpo policlonal de conejo anti-Bag3, Abcam; anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bag3, Abcam; anticuerpo policlonal de conejo anti-Bag3 humana, Abcam; anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bag3 humana, clon 5A8, Abgent; anticuerpo policlonal anti-Bag3, Abnova Corporation; anticuerpo policlonal de cabra anti-Bag3, Abnova Corporation; anticuerpo policlonal de ratón anti-Bag3, Abnova Corporation; anticuerpo policlonal de conejo anti-Bag3 humana, Atlas Antibodies; anticuerpo policlonal de cabra anti-Bag3/BIS/CAIR1, Everest Biotech; anticuerpo policlonal de cabra anti-Bag3, GeneTex; anticuerpo policlonal de conejo anti-Bag3 humana, GeneTex; anticuerpo policlonal de cabra anti-proteína BIS de unión a Bcl-2 (BAG3) humana, LifeSpan BioSciences; anticuerpo policlonal de conejo anti-proteína BIS de unión a Bcl-2 (BAG3) humana, LifeSpan BioSciences; anticuerpo policlonal de cabra anti-Bag3, Novus Biologicals; anticuerpo policlonal de ratón anti-Bag3 humana, Novus Biologicals; anticuerpo policlonal de conejo anti-Bag3, Novus Biologicals; anticuerpo policlonal de conejo anti-Bag3 humana, Novus Biologicals; anticuerpo policlonal de cabra anti-BAG3/BIS/CAIR1 humana, Raybiotech, Inc.; anticuerpo policlonal de conejo anti-Bag3 humana, Proteintech Group, Inc.; anticuerpo de conejo anti-BAG3 humana Prestige Antibodies Powered by Atlas Antibodies, Sigma-Aldrich; etc.), preferiblemente si son monoclonales.

El ensayo inmunológico es preferiblemente ELISA, en el que el primer ligando de captura es un anticuerpo, incluso

más preferiblemente seleccionado de anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos en la secuencia de BAG3 que corresponde a los aa 18-33, 385-399 ó 533-547; el segundo anticuerpo para la detección, que reconoce un epítopo diferente del reconocido por el anticuerpo de captura, puede ser un anticuerpo monoclonal, una mezcla de al menos dos anticuerpos monoclonales o un anticuerpo policlonal.

5 Aunque la realización preferida del ensayo implica el uso de anticuerpos anti-BAG3, puede lograrse el mismo resultado con moléculas de unión a BAG3 distintas de anticuerpos, por ejemplo receptores solubles o ligandos naturales o sintéticos. El ligando usado para la detección puede a su vez reconocerse por anticuerpos, por ejemplo anticuerpos marcados con fluoróforos, cromóforos o enzimas que pueden convertir un sustrato en un cromóforo, por tanto útiles para visualizar la presencia de BAG3 en la muestra biológica; alternativamente puede unirse directamente a tales grupos de cromóforo.

10 Pueden identificarse esquemas de reacción diferentes que son igualmente válidos para detectar y/o medir el nivel de BAG3 soluble. Por ejemplo es posible usar, para la captura, un primer anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal anti-BAG3, preferiblemente seleccionado de anticuerpos monoclonales producidos por el clon parental PD2009 (AC-1, AC-2 o AC-3 que reconocen un epítopo individual de la secuencia de BAG3, y en particular la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 18-33, 385-399 ó 533 -547, respectivamente). Para la detección, es posible usar un segundo anticuerpo que puede ser un anticuerpo monoclonal o uno policlonal (si es policlonal, el anticuerpo se denomina preferiblemente TOS-2, tal como se describe por Rosati *et al.*, 2007 (a), obtenido contra la proteína recombinante completa usada como inmunógeno) o un anticuerpo monoclonal obtenido del clon parental PD2009 pero diferente del anticuerpo usado para la captura, tal como, por ejemplo, AC-2 o AC-3, o una mezcla de los dos, que reconocen epítomos que son diferentes del epítopo reconocidos por AC-1 (que corresponde a las secuencias de aminoácidos 385-399 y 533-547 de la proteína BAG3, respectivamente).

15 Un experto en la técnica puede determinar las variaciones de los esquemas de captura y/o detección de BAG3 anteriores incluso si se usan anticuerpos monoclonales o policlonales que son diferentes de los descritos para las realizaciones preferidas del ensayo. Por ejemplo, el método comprende el uso de anticuerpos derivados de los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente, tales como los expresados de forma recombinante (tal como, por ejemplo, fragmentos ScFv, minicuerpos, diacuerpos etc.) o modificados, por ejemplo, mediante humanización, etc.

20 Generalmente, la detección de BAG3 soluble se realiza según un esquema en sándwich en el que la proteína soluble en el suero interacciona con una primera molécula inmovilizada sobre la fase sólida (ligando de BAG3, en la etapa de captura) y después con una segunda molécula que permite la detección colorimétrica o fluorimétrica directa o indirecta mediante la unión de la proteína BAG3 soluble que ya se ha unido al ligando de captura, al nivel de un sitio diferente. El segundo ligando se denomina ligando de detección. El método también incluye una realización del ensayo en la que el primer agente de captura o el segundo agente de detección se adsorben, se adhieren o se unen covalentemente a una matriz (también denominada fase sólida), por ejemplo una placa de microtitulación o perlas o la pared de un tubo.

25 Alternativamente BAG3 soluble puede detectarse en el suero también tras la separación molecular (por ejemplo mediante SDS-PAGE) y reconocimiento de anticuerpo posterior, por ejemplo mediante inmunotransferencia de tipo western, o mediante secuenciación de la proteína separada basándose en el peso molecular.

30 El método de ensayo propuesto permite la separación del grupo de pacientes con problemas cardiacos del grupo de pacientes sanos, preferiblemente en grupos de edad comparable. Además, estratifica los propios pacientes con problemas cardiacos, identificando subpoblaciones de pacientes con un mayor riesgo (insuficiencia cardiaca) con un pronóstico más desfavorable.

35 Por cardiopatía se quiere decir una patología seleccionada del corazón, por ejemplo seleccionada del grupo que consiste en: angina de pecho, angina inestable, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, enfermedad coronaria aguda, insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica, daño cardiaco debido a fármacos, etc.

40 Los valores de BAG3 en suero característicos de un estado normal o uno patológico se notifican a continuación sólo como ejemplo debido a que pueden variar con el esquema usado para el ensayo. La concentración de BAG3 soluble es en promedio de 2,38 ng/ml \pm 0:32, sin embargo en el grupo de edad de desde 21 hasta 43 años, la concentración en suero promedio de BAG3 es de 3,13 ng/ml (\pm 0,50), mientras que es de 1,80 ng/ml (\pm 0,40) en donantes entre 44 y 65 años de edad.

45 En sueros de pacientes con diagnóstico clínico de cardiopatía (de diverso tipo y grado), la presencia de proteína BAG3 soluble en un intervalo de edad comprendido entre 49 y 81 años (edad promedio: 68,04 \pm 6,9), la concentración de BAG3 detectada es en promedio de 8,30 ng/ml \pm 0:58.

50 En pacientes afectados por adenocarcinoma pancreático, la concentración de BAG-3 soluble es generalmente mayor de 10 ng/ml con un promedio de 130,8 ng/ml (\pm 59,4). Según un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de la proteína BAG3 humana soluble como marcador de un estado patológico. En particular, el estado patológico es una cardiopatía y se selecciona del grupo que consiste en: angina de pecho, angina inestable, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, enfermedad coronaria aguda, insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia

cardíaca crónica, daño yatrogénico cardíaco, etc., o un tumor pancreático, preferiblemente un adenocarcinoma.

Sin limitarse a ninguna teoría específica, la secreción BAG3 por células pancreáticas y cardiomiocitos podría representar una respuesta celular "fisiológica" al estrés que se origina, en el caso del corazón, de la lesión patógena y, en el caso del adenocarcinoma pancreático, de la privación de oxígeno y/u otros nutrientes.

- 5 Además, la divulgación se refiere al uso de la proteína BAG3 humana soluble para activar células diana del sistema inmunitario, preferiblemente macrófagos de mamífero, ya que BAG3 es una proteína altamente conservada. El alcance de protección se define por las reivindicaciones.

Parte experimental

Ejemplo 1. Aislamiento de clones AC-1, AC-2, AC-3 a partir del hibridoma parental

- 10 Se aislaron los anticuerpos monoclonales AC-1, 2 y 3 mediante subclonación a partir del hibridoma parental, que se depositó con el n.º PD02009 el 17/12/2002 en el Centro de biotecnología avanzada de Génova y se describe en el documento U.S. 7.537.760, y se seleccionaron mediante ensayos ELISA en el medio de cultivo.

Ejemplo 2. La proteína BAG3 soluble se purifica a partir del suero de pacientes con cardiopatía.

- 15 Se analizó el suero de un paciente afectado por cardiopatía isquémica crónica mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se eluyó en gel la banda que correspondía a 75 KD (véase la figura 1a) y se analizaron los fragmentos obtenidos mediante digestión con tripsina mediante espectrometría de masas (MALDI/EM) y se identificaron a través del software "MASCOT". El análisis de algunas secuencias de péptido (figura 1b) permitió la identificación de la proteína como de tipo BAG3.

Ejemplo 3. Desarrollo de un modelo de estrés de miocardio en ratas.

- 20 Se anestesiaron ratas macho Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Italia), que pesaban alrededor de 220-250 gramos, con inyección intraperitoneal de pentobarbital (60 mg/kg) por vía oral y luego se intubaron. Tras toracotomía anterior, se extrajo el corazón y se sometió a sutura del tracto anterior proximal de la arteria coronaria descendente. Los animales control se sometieron al mismo procedimiento excepto la ligación de la arteria. El día después del procedimiento, se seleccionaron todos los supervivientes mediante ecocardiografía transtorácica para determinar la presencia de infartos grandes que implican al menos el 35% del ventrículo izquierdo (grupo IM).
- 25 Entonces se sacrificaron las ratas mediante procedimientos convencionales y se trató el ventrículo izquierdo con formalina para procedimientos inmunohistoquímicos. La figura muestra datos de expresión de proteína BAG3 representativos de grupos control e IM.

- 30 La figura 2 muestra los resultados de inmunohistoquímica obtenidos con un anticuerpo monoclonal específico para BAG3 descrito en el ejemplo 1: se observa un aumento significativo de los niveles de proteína BAG3 en tejido cardíaco de ratas tras la inducción de infarto mediante oclusión temporal de la aorta.

Los análisis de inmunotransferencia de tipo Western revelaron entonces que la proteína BAG3 se libera en el sobrenadante de cardiomiocitos expuestos a estrés oxidativo inducido por PEITC (isotiocianato de fenilo) (figura 3).

- 35 En este experimento se sembraron en placa cardiomiocitos de rata, a una confluencia del 80% y se incubaron en medio que carecía de suero a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂, se trataron con PEITC 10 µM durante los tiempos indicados en la figura.

- 40 Al final del experimento, se recogieron las células y se procesaron. Se analizó el lisado de proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos anti-BAG3 (TOS-2 y AC-1) para evaluar los niveles de expresión de BAG3 intracelular, y anticuerpo anti-GAPDH usado como control de carga (figura 3A); en la figura 3B, se recogieron los sobrenadantes, se precipitaron con acetona (1:9 vol.) y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western.

- 45 También se detectó la presencia de BAG3 en el sobrenadante de las líneas celulares Hep G2 (carcinoma hepatocelular humano), C6 (glioblastoma de rata), Panc-1 (adenocarcinoma pancreático humano), ARO (carcinoma tiroideo anaplásico) y HT-29 (adenocarcinoma colorrectal). BAG3 se libera por las diversas líneas celulares tumorales sometidas a prueba pero no en el medio de cultivo de células primarias normales tales como HUVEC (células endoteliales de cordón umbilical humanas).

Ejemplo 4. Desarrollo de una prueba ELISA para la medición de BAG-3 en suero.

- 50 Para someter a prueba si la proteína BAG3 podía detectarse en la sangre de pacientes con cardiopatía, se ha desarrollado una prueba ELISA usando como calibrador la proteína recombinante BAG3 preparada tal como se describe a continuación.

Las diferentes combinaciones de anticuerpos específicos para BAG3 sometidos a prueba son:

a):

- un primer anticuerpo monoclonal, clon AC-1, diseñado para reconocer la secuencia de aa 18-33 de la proteína BAG3 (DRDPLPPGYEIKIDPQ);

5 - un segundo anticuerpo policlonal denominado TOS-2, desarrollado usando como inmunógeno la proteína recombinante completa (Sec. de ref.: NP_004272), se usó en cambio como detector de la proteína BAG3 capturada por el anticuerpo AC-1;

b):

- un primer anticuerpo monoclonal, clon AC-1;

10 - un segundo anticuerpo monoclonal denominado AC-2, diseñado para reconocer la secuencia de aa 385-399 de la proteína BAG3 (SSPKSVATEERAAPS) y usado como detector;

c):

- un primer anticuerpo monoclonal, clon AC-1;

- un segundo anticuerpo monoclonal denominado AC-3, diseñado para reconocer la secuencia de aa 533-547 de la proteína BAG3 (DKGKKNAGNAEDPHT) y usado como detector;

15 d):

- un primer anticuerpo monoclonal, clon AC-1;

- una mezcla de anticuerpos AC-2 y AC-3 usados como detector;

e):

- un primer anticuerpo monoclonal, clon AC-2;

20 - como detectores: AC-1 o AC-3, o una mezcla de anticuerpos AC-1 y AC-3;

f):

- un primer anticuerpo monoclonal, clon AC-3;

- como detectores: AC-1 o AC-2, o una mezcla de anticuerpos AC-1 y AC-2.

25 Todas las combinaciones sometidas a prueba pueden identificar, de manera cuantitativa, la presencia de BAG-3 soluble en el suero de pacientes, mediante la prueba ELISA. Un ejemplo ilustrativo en la figura 4 muestra el desarrollo de una curva de calibración con concentraciones escalares de proteína BAG3 recombinante reconstituida en solución salina con la adición de albúmina sérica bovina al 3% (BSA).

30 Se produjo la proteína recombinante a partir de ADNc que codifica para la proteína BAG3, que corresponde a los nucleótidos 1 a 2608 de la secuencia de PubMed de NCBI: NM_004281.3 humana, amplificada mediante PCR a partir de ARN total obtenido de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y entonces se clonó en el vector de expresión pET 30a (+) (Novagen) usando las enzimas de restricción NcoI/XhoI.

Se expresó la proteína recombinante resultante fusionada a residuos de seis histidinas en *E. coli* y se purificó mediante cromatografía de afinidad con columnas HisTrap HP (GE Healthcare).

35 Entonces se funcionalizaron microplacas de 96 pocillos mediante la adición de una disolución que contenía el anticuerpo AC-1 y posteriormente se trataron con disolución de bloqueo para impedir interacciones no específicas. Entonces se añadió la proteína recombinante a las concentraciones mostradas en la figura, se reveló mediante el anticuerpo policlonal TOS-2. Se obtuvo la señal mediante el uso de un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con hidroxidasa (HRP) y adición posterior de reactivo TMB (eBioscience, RU).

40 Se probó que el ensayo era útil para analizar la presencia de proteína BAG3 soluble en el suero de pacientes con insuficiencia cardíaca.

Ejemplo 5. Validación del ensayo ELISA en el suero de pacientes con cardiopatía y cáncer pancreático.

Se recogieron sueros de donantes sanos para comprobar la concentración en suero de BAG3 en sujetos que no padecían ningún tipo de enfermedad sintomática. El intervalo de edad de los donantes era de desde 21 hasta 65 años. La concentración de BAG3 detectada era en promedio 2,38 ng/ml \pm 0,32.

45 Hubo una diferencia de concentraciones leve, relacionada con la edad. En particular, en el grupo de edad de 21 - 43

años, la concentración en suero promedio de BAG3 es de 3,13 ng/ml (\pm 0,50), mientras que es de 1,80 ng/ml (\pm 0,40) en donantes entre 44 y 65 años de edad (figura 5).

Entonces se recogieron sueros de 38 pacientes con diagnóstico clínico de cardiopatía (de diverso tipo y grado) para analizar la presencia de proteína BAG3 soluble. El intervalo de edad de los pacientes examinados comprendía entre 49 y 81 años (edad media: 68,04 \pm 6,9). La concentración de BAG3 detectada era en promedio 8,30 ng/ml \pm 0:58.

La diferencia entre pacientes con cardiopatía y donantes sanos, tanto totales como en el mismo intervalo de edad de pacientes, es altamente significativa (figura 6).

Además, se reconocieron dos poblaciones entre pacientes con cardiopatía, que consistían en sujetos con o sin insuficiencia cardiaca, y se caracterizaban por niveles en suero de proteína BAG3 diferentes, tal como se describe en la figura 8 que muestra gráficamente las concentraciones en suero de BAG3 en pacientes con diagnóstico de insuficiencia cardiaca en comparación con pacientes con cardiopatía no descompensada.

Además, también se midieron los niveles en suero de BAG-3 soluble en algunos pacientes con cáncer pancreático, cáncer de colon o cáncer de pulmón. Sólo se midieron niveles en suero por encima de 70 ng/ml en pacientes con cáncer pancreático, tal como se muestra en la siguiente tabla 1.

Tabla 1. Niveles de BAG-3 soluble en sueros de pacientes con cáncer

Adenocarcinoma pancreático	Concentración en suero de BAG-3 (ng/ml)
Paciente 1, páncreas	222,5
Paciente 2, páncreas	157,6
Paciente 3, páncreas	102,7
Paciente 4, páncreas	77,4
Paciente 5, páncreas	94
Cáncer de colon	
Paciente 1, colon	0
Paciente 2, colon	0
Paciente 3, colon	0
Carcinoma de pulmón	
Paciente 1, pulmón	0
Paciente 2, pulmón	0

Ejemplo 6. Determinación de sensibilidad y especificidad del ensayo ELISA

Se analizaron entonces los datos obtenidos a través de un programa de análisis estadístico para definir los valores de sensibilidad y especificidad del ensayo ELISA para la detección de la proteína BAG3 en pacientes con insuficiencia cardiaca.

Usando 2,76 ng/ml como valor de punto de corte, los valores de sensibilidad y especificidad son el 83,3% y el 77,08%, respectivamente, mientras que los valores predictivos positivos y negativos son el 75% y el 88,1%, respectivamente. La figura 7 muestra la curva ROC obtenida con el punto de corte indicado.

Ejemplo 7. Caracterización de la actividad funcional de la proteína BAG3 soluble.

Se usó la proteína BAG3 recombinante para ensayos de activación de macrófagos, para determinar el posible papel en células sanguíneas de la proteína liberada en el suero. Para este fin, se trató la línea celular J774 de monocitos murinos con concentraciones diferentes de la proteína BAG3 recombinante, usando un agente proinflamatorio tal como lipopolisacárido (LPS) como control positivo. Se sembraron en placa células J774 a una confluencia del 60% y se incubaron durante 24 h con la proteína BAG3 recombinante a concentraciones de 250, 500 ng/ml y 1 mg/ml, solas o en combinación con LPS a una concentración de 10 ng/ml.

Al final del experimento, se recogieron las células y se procesaron. Se analizó el lisado de proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos anti-iNOS (iNOS: óxido nítrico sintasa inducible) para evaluar los niveles de expresión de la enzima, y con anticuerpo contra GAPDH, usados como control de carga. Los datos se muestran en la figura 9 a).

Además, se verificó la producción de nitritos en el medio de cultivo, que se correlaciona con la activación de monocitos, con el reactivo de Griess (sulfanilamida al 1%, naftiletilendiamina al 0,1%, ácido fosfórico al 5%) y se midió en un espectrofotómetro DU-62 de Beckman a 550 nM (figura 9 b).

La figura 9 b) muestra que la proteína recombinante, a una concentración de 500 ng/ml, aumentó tres veces la producción de nitritos en comparación con el control (que consiste en células no tratadas) ($p < 0,001$); además su actividad es dependiente de la dosis. (Figura 9 a y b)).

Entonces se conjugó la proteína recombinante BAG3 con FITC usando el kit de conjugación de FITC FluoroTag

(Sigma). Se añadieron cantidades iguales de BSA-FITC (control negativo) y rBAG3-FITC al medio de cultivo durante 1 hora. Entonces se fijaron las células con una disolución de formaldehído al 3,7% y se analizaron mediante un microscopio confocal LSM de Zeiss.

5 Se confirmó la unión de la proteína BAG3 a la superficie de células J774 mediante el uso de la proteína recombinante conjugada con un fluoróforo (figura 10). La unión de BAG3 es específica ya que no se observa cuando se usan otras proteínas, por ejemplo BSA, en lugar de BAG3.

Bibliografía

10 1. Bonelli, P., Petrella A., Rosati, A., Romano, M.F., Lerose, R., Pagliuca, M.G., Amelio, T., Festa, M., Martire, G., Venuta, S., Turco, M.C., y Leone, A. (2004). BAG3 protein regulates stress-induced apoptosis in normal and neoplastic leukocytes. *Leukemia* 18, 358-360.

2. Bruno, A.P., Festa, M., Dal Piaz, F., Rosati, A., Turco, M.C., Giuditta, A., Marzullo, L. (2008). Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein. *Cell Cycle* 7(19), 3104-3105.

3. Carra, S., Seguin, S.J., Landry, J. (2008a). HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy* 4(2), 237-239.

15 4. Carra, S., Seguin, S.J., Lambert, H., Landry, J. (2008b). HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem* 18, 283(3), 1437-1444.

5. Chen, L., Wu, W., Dentchev, T., Zeng, Y., Wang, J., Tsui, I., Tobias, J.W., Bennett, J., Baldwin, D., Dunaief, J.L. (2004). Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Exp Eye Res* 79(2), 239-247.

20 6. Chiappetta, G., Ammirante, M., Basile, A., Rosati, A., Festa, M., Monaco, M., Vuttariello, E., Pasquinelli, R., Arra, C., Zerilli, M., Todaro, M., Stassi, G., Pezzullo, L., Gentilella, A., Tosco, A., Pascale, M., Marzullo, L., Belisario, M.A., Turco, M.C. y Leone, A. (2007). The antiapoptotic protein BAG3 is expressed in thyroid carcinomas and modulates apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Clin Endocrinol Metab* 92(3); 1159-1163.

25 7. Franceschelli, S., Rosati, A., Le Rose, R., Turco, M.C., Pascale, M. (2008). Bag3 gene expression is regulated by heat shock factor 1. *J Cell Physiol* 19, 215(3), 575-577.

8. Gentilella, A., Passiatore, G., Deshmane, S., Turco, M.C., Khalili, K. (2008). Activation of BAG3 by Egr-1 in response to FGF-2 in neuroblastoma cells. *Oncogene* 28, 27(37), 5011-5018.

9. Homma, S., Iwasaki, M., Shelton, G.D., Engvall, E., Reed, J.C., Takayama, S. (2006). BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am J Pathol* 169(3), 761-773.

30 10. Iwasaki, M., Homma, S., Hishiya, A., Dolezal, S.J., Reed, J.C., Takayama, S. (2007). BAG3 regulates motility and adhesion of epithelial cancer cells. *Cancer Res* 1, 67(21), 10252-10259.

11. Kassis, J.N., Guancial, E.A., Doong, H., Virador, V., Kohn, E.C. (2006). CAIR-1/BAG-3 modulates cell adhesion and migration by downregulating activity of focal adhesion proteins. *Exp Cell Res* 10, 312(15), 2962-2971.

35 12. Liao, Q., 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 lines. *FEBS Lett* 503, 151-157.

13. Pagliuca, M.G., Lerose, R., Cigliano, S. and Leone, A. (2003). Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, a modulator of Hsp70 activity. *FEBS Lett* 541, 11-15.

40 14. Romano, M.F., Festa, M., Putrella, A., Rosati, A., Pascale, M., Bisogni, R., Poggi, L., Kohn, E.C., Venuta, S., Turco, M.C. y Leone, A. (2003b). BAG3 protein regulates cell survival in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Biol Ther* 2, 508-510.

15. Romano, M.F., Festa, M., Pagliuca, G., Lerose, R., Bisogni, R., Chiurazzi, F., Storti, G., Volpe, S., Venuta, S., Turco, M.C. y Leone, A. (2003a). BAG3 protein controls B-chronic lymphocytic leukaemia cell apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 383-385.

45 16. Rosati, A., Leone, A., Del Valle, L., Amini, S., Khalili, K. y Turco, M.C. (2007a). Evidence for BAG3 modulation of HIV-1 gene transcription. *J Cell Physiol* 210(3), 676-683.

17. Rosati, A., Ammirante, M., Gentilella, A., Basile, A., Festa, M., Pascale, M., Marzullo, L., Belisario, M.A., Tosco, A., Franceschelli, S., Moltedo, O., Pagliuca, G., Lerose, R. y Turco, M.C. (2007b). Apoptosis inhibition in cancer cells: a novel molecular pathway that involves BAG3 protein. *IJBCB* 39 7-8, 1337-1342.

50 18. Tabuchi, S., Asaeda, M., Kamitan, H., Watanabe, T. (2006). Surgical treatment of arteriovenous malformation in a

patient with human immunodeficiency virus infection and hemophilia a: case report. J Stroke Cerebrovasc Dis 15(2), 66-8.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la presencia y/o concentración de la proteína BAG3 soluble en una muestra biológica desconocida, que comprende las etapas de:
 - 5 a. determinar la presencia o valores de concentración de BAG3 soluble en una muestra biológica obtenida anteriormente, que consiste en suero o plasma;
 - b. comparar los valores obtenidos de la muestra con valores de referencia o con los valores obtenidos de muestras biológicas de referencia,
 - c. opcionalmente, determinar agrupaciones adicionales de valores similares o división en grupos con valores medios estadísticamente diferentes,
 - 10 d. asociar la presencia y/o el nivel de BAG3 soluble con un estado patológico seleccionado del grupo que consiste en cardiopatía o cáncer pancreático.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de determinación b) se realiza con ligandos específicos para BAG3 soluble.
- 15 3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha muestra biológica es de origen humano.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que se añaden sustancias anticoagulantes a dicha muestra biológica.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que dichos ligandos específicos son anticuerpos.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha etapa de determinación b) se realiza por medio de anticuerpos anti-BAG3 monoclonales, policlonales o recombinantes o sus fragmentos (scFv, diacuerpos, minicuerpos).
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicho anticuerpo es monoclonal y reconoce al menos un epítipo de BAG3 seleccionado del grupo que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos: 18-33, 385-399 ó 533-547 de la secuencia primaria de BAG3 o es un derivado recombinante del mismo, humanizado o modificado de otra manera por recombinación.
- 25 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en el que dichos anticuerpos o ligandos están marcados con fluoróforos, cromóforos o enzimas que pueden convertir un sustrato en un cromóforo.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que dicha etapa de determinación b) se realiza usando un ELISA de sándwich con un ligando de captura y un ligando de detección de BAG3, en el que tanto el primero como el segundo son anticuerpos monoclonales y en el que el segundo anticuerpo reconoce un epítipo diferente del reconocido por el anticuerpo de captura usado, o es una mezcla de varios anticuerpos monoclonales.
- 30 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que dicho estado patológico es cardiopatía.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicha cardiopatía (etapa (d)) se selecciona del grupo que consiste en: angina de pecho, angina preinfarto, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, enfermedad coronaria aguda, insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica o cardiopatía yatrogénica.
- 35 12. Uso de la proteína BAG3 soluble humana como marcador en suero de un estado patológico seleccionado de cardiopatía o un cáncer pancreático.
- 40 13. Uso según la reivindicación 12, en el que dicha cardiopatía se selecciona del grupo que consiste en: angina de pecho, angina preinfarto, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, enfermedad coronaria aguda, insuficiencia cardiaca aguda, insuficiencia cardiaca crónica y cardiopatía yatrogénica.

Figura 1

a)



100 kDa

b)

Inicio-final	Observada	Mr(esp.)	Mr(calc.)	ppm	Secuencia desconocida
32 - 47	1915,8500	1914,8427	1914,9013	-31	K.IDPQTGWPFVVDHNSR.T
48 - 55	990,3800	989,3727	989,4567	-85	R.TTTWNDPR.V
63 - 73	1062,4700	1061,4627	1061,4738	-10	K.DTASSANGPSR.N
78 - 82	611,4200	610,4127	610,4166	-6	R.LLLPIR.E
109 - 123	1764,8800	1763,8727	1763,8856	-7	R.QPHLFHAYSQPGVQR.F
200 - 209	1081,5600	1080,5527	1080,5676	-14	R.SSLGSHQLPR.G
256 - 267	1481,7300	1480,7227	1480,7423	-13	K.IQGDDWEPRPLR.A

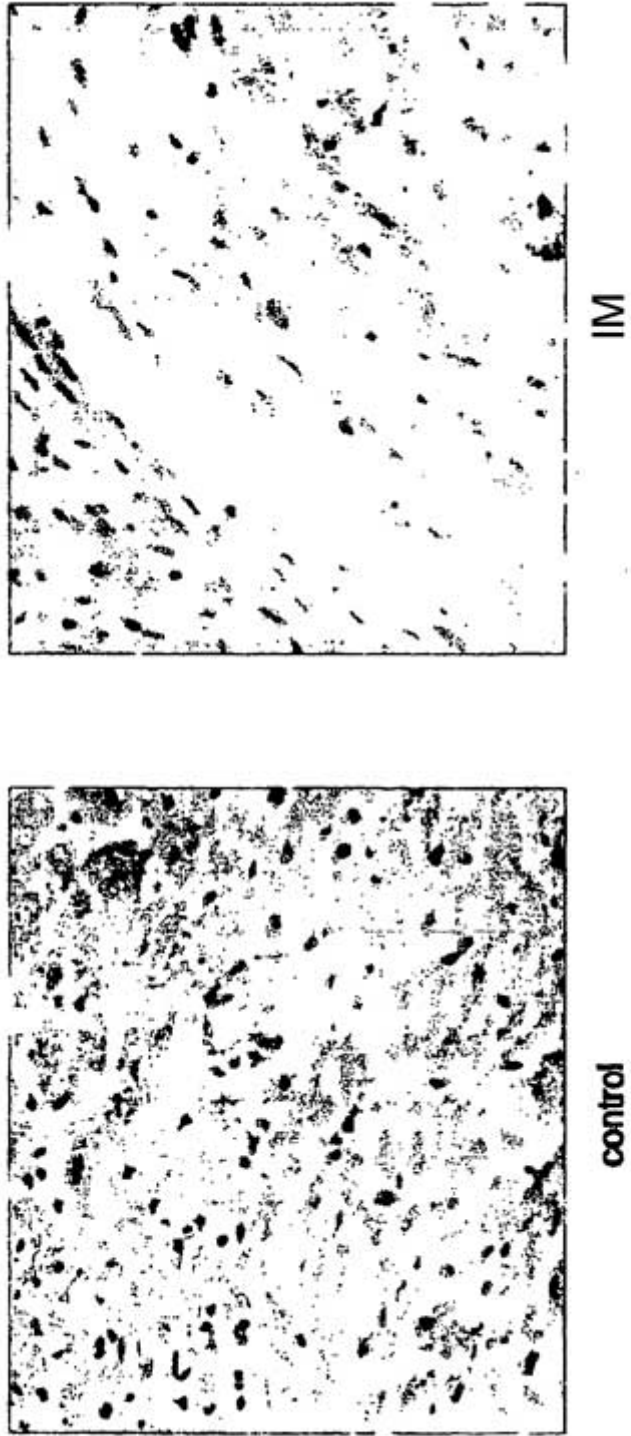
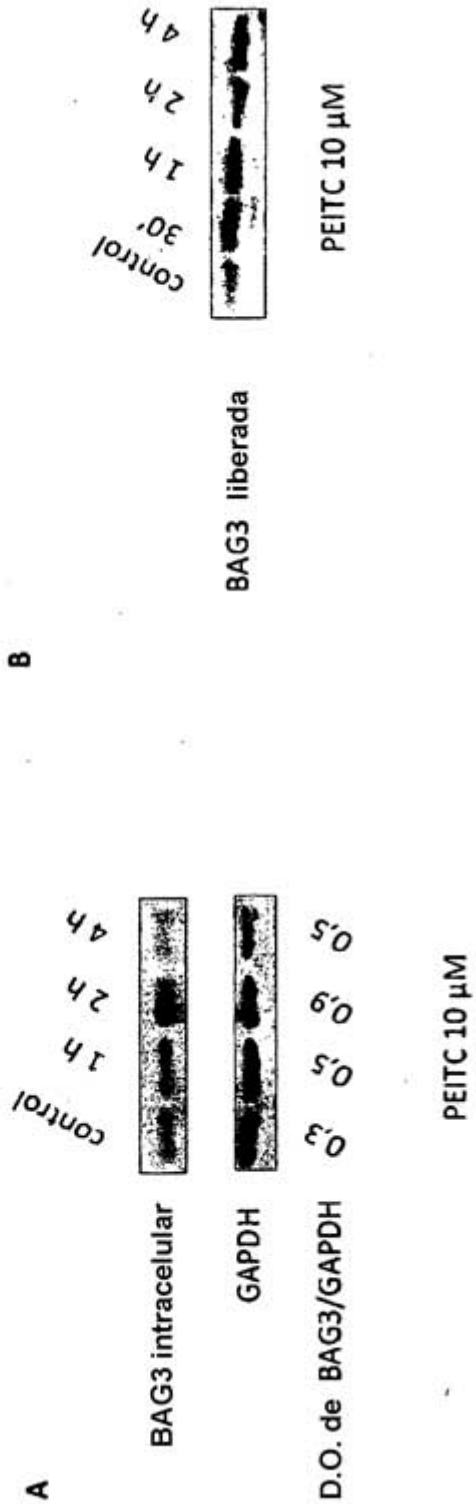
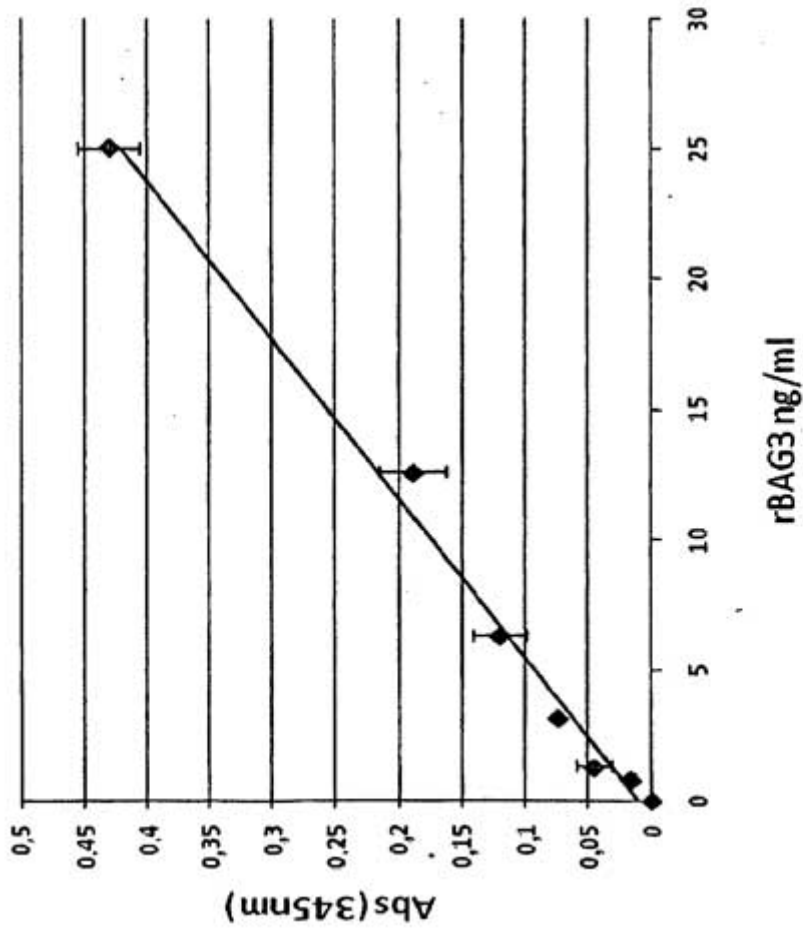


Figura 2

Figura 3





rBAG3 ng/ml	Abs (345 nm)	desv. est.
0	0	0
0,78	0,017	0,025
1,25	0,074	0,027
3,12	0,045	0,021
6,25	0,121	0,001
12,5	0,189	0,013
25	0,431	0,004

Figura 4

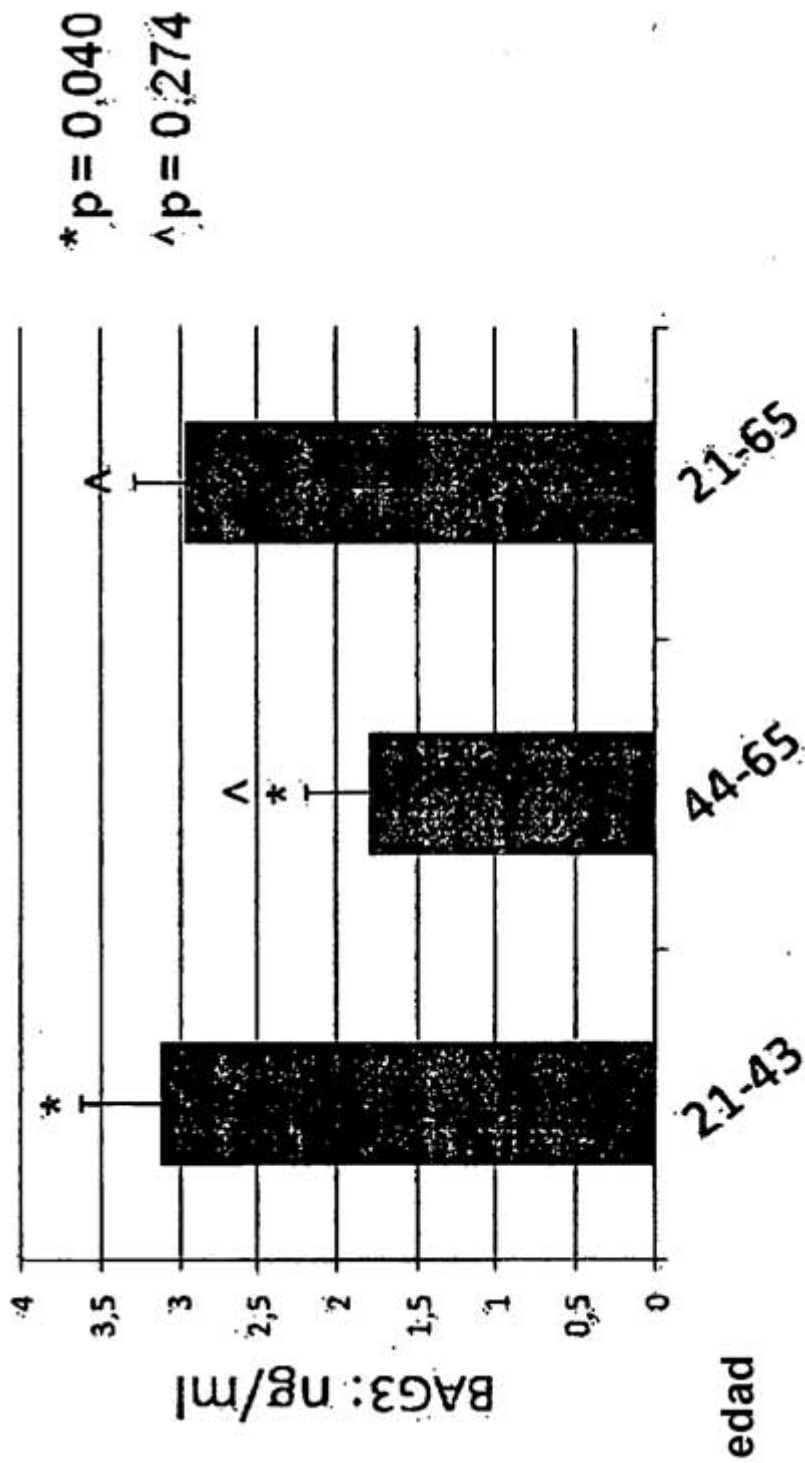
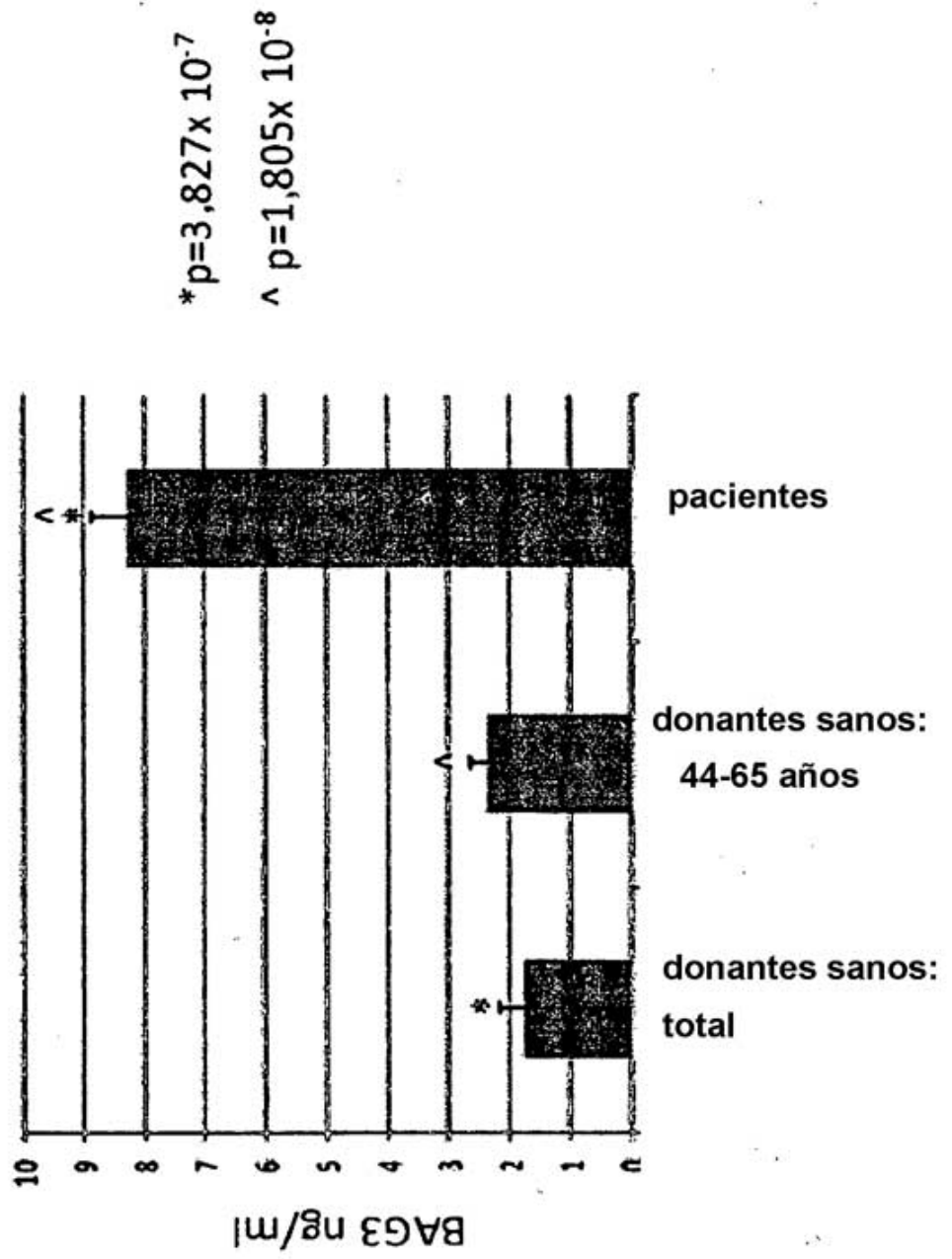


Figura 5

Figura 6



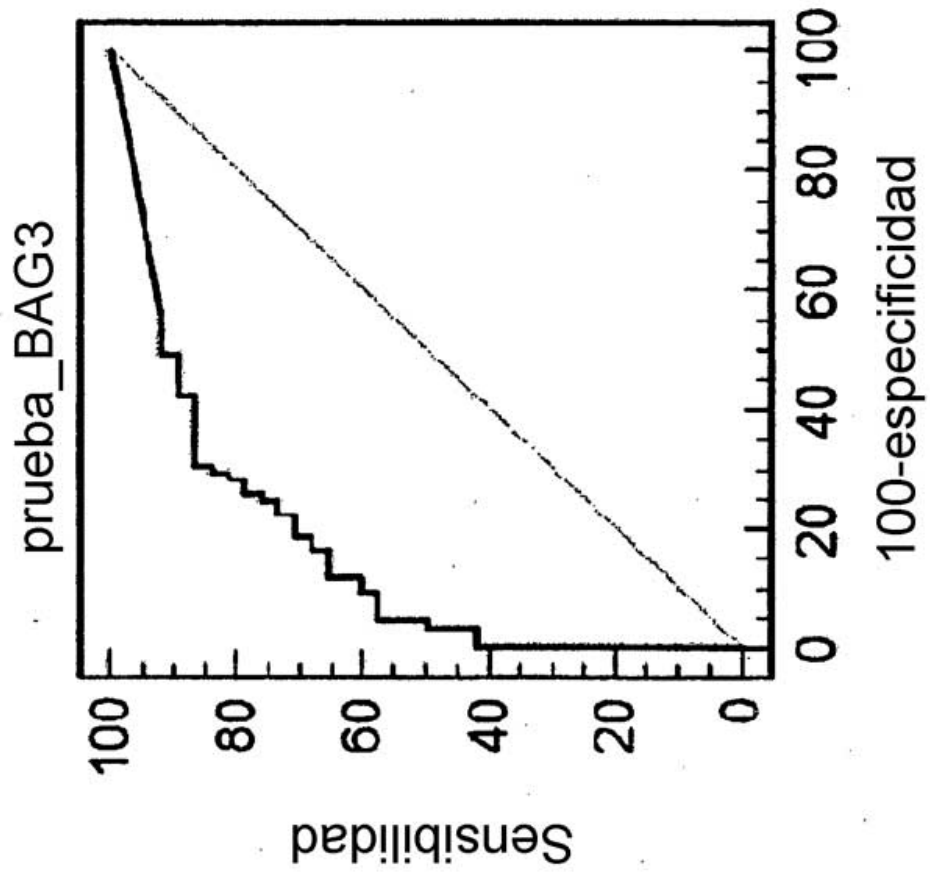


Figura 7

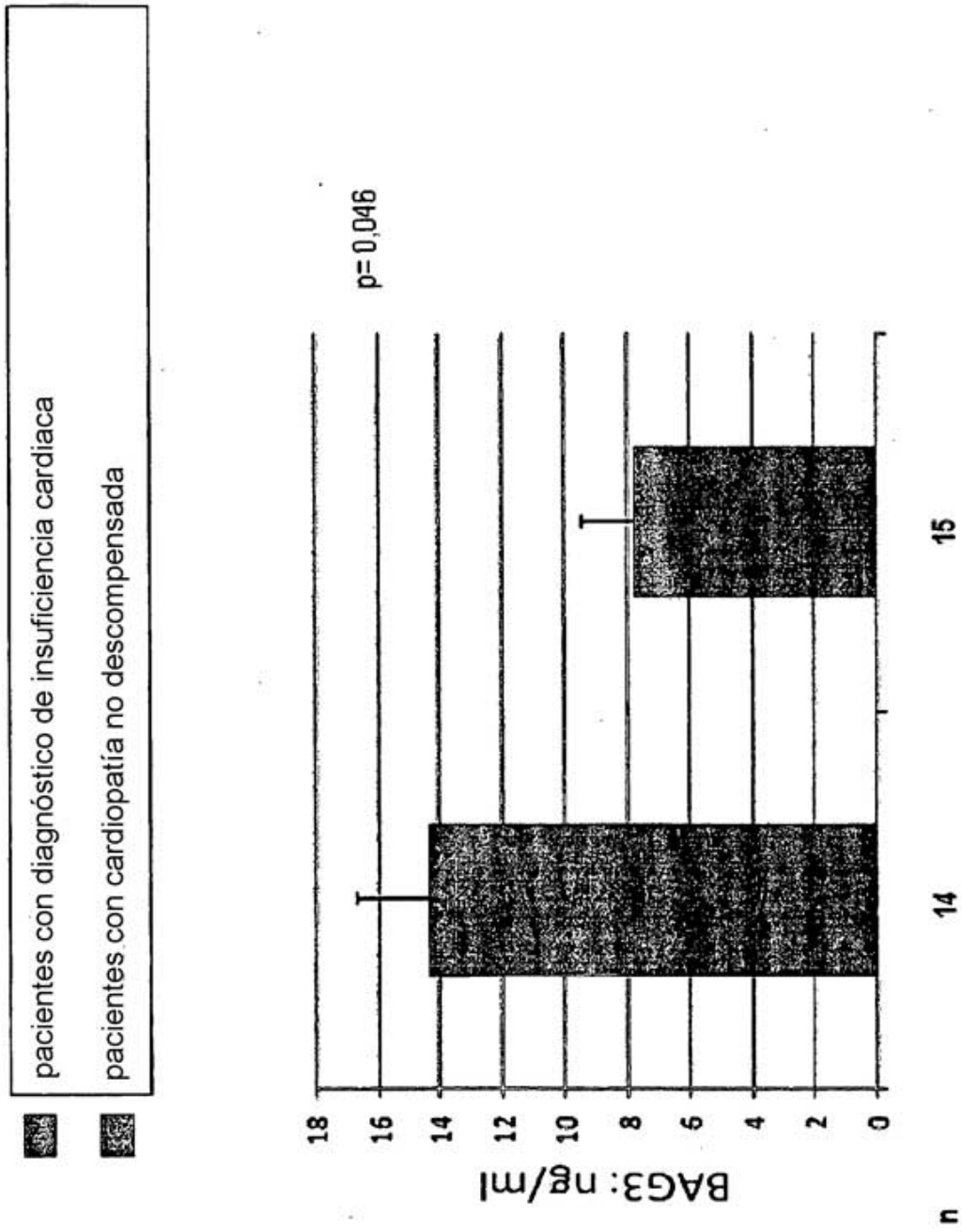


Figura 8

Figura 9 a)

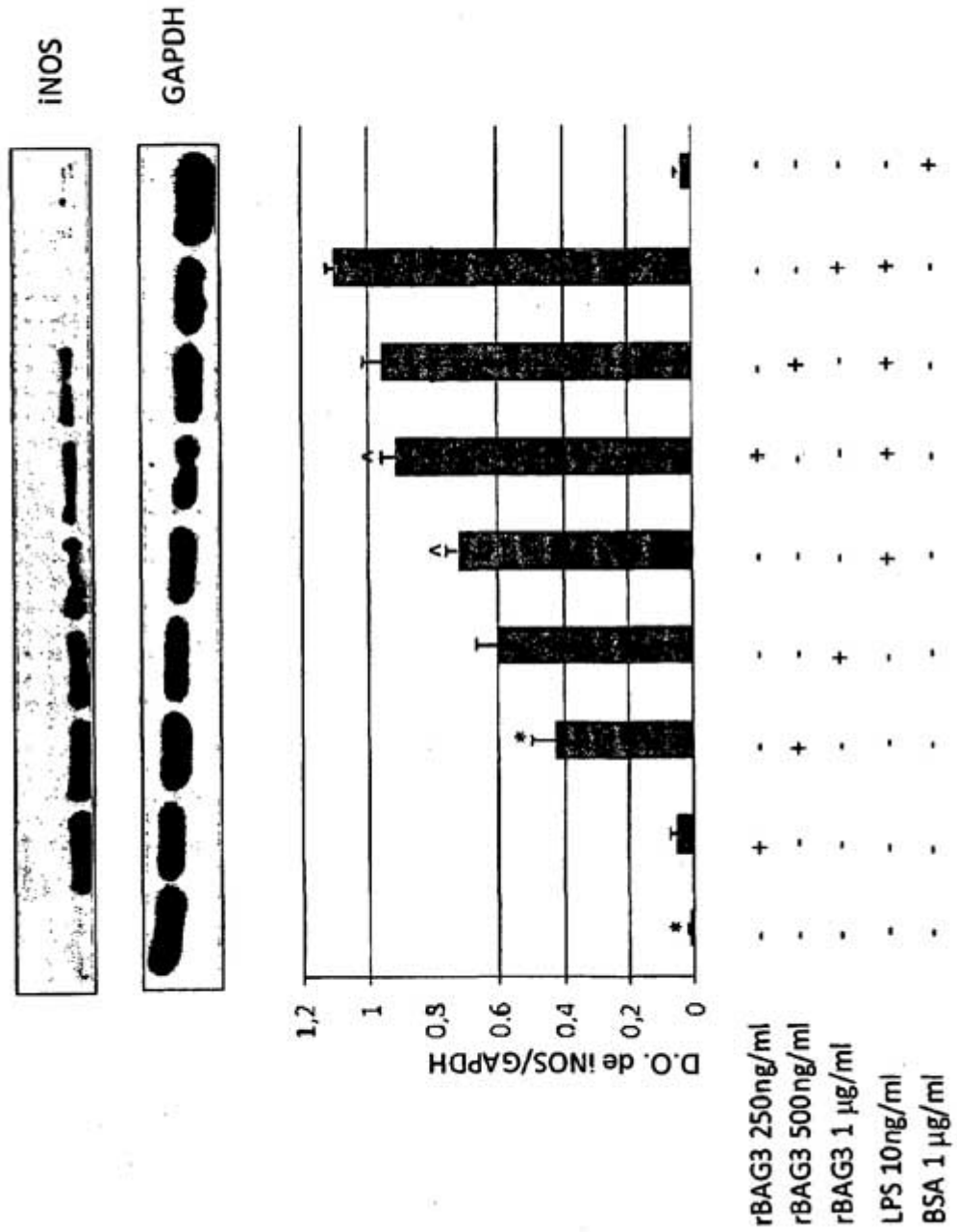


Figura 9 b)

