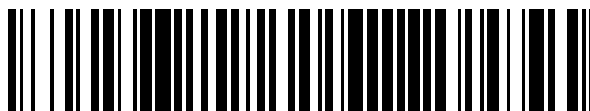


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 257**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2014 PCT/IB2014/063352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15019230**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2014 E 14758663 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3030320**

54 Título: **Moléculas de unión al receptor de BAG3 para su uso como un medicamento**

30 Prioridad:

07.08.2013 IT MI20131351

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

14.11.2019

73 Titular/es:

**BIOUNIVERSA S.R.L. (100.0%)
Via Antonio Gramsci 85
83025 Montoro (AV), IT**

72 Inventor/es:

TURCO, MARIA CATERINA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 731 257 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

Moléculas de unión al receptor de BAG3 para su uso como un medicamento

5 **Antecedentes técnicos**

5 BAG3, una proteína citoplásmica de 74 kDa, pertenece a la familia de co-chaperoninas que interactúan con el dominio ATPasa de la proteína HSP70 (proteína de choque térmico) a través del dominio estructural conocido como el dominio BAG. Además, la proteína BAG3 contiene un dominio WW (Trp-Trp), una región rica en prolina (PXXP), y dos motivos conservados IPV (Ile-Pro-Val), que pueden mediar la unión a otras proteínas. Gracias a la naturaleza de la proteína BAG3 como un adaptador (atribuible a la presencia de muchos dominios funcionales), tal proteína puede, por tanto, interactuar con diferentes proteínas. En seres humanos, la expresión del gen bag3 es constitutiva en unos pocos tipos de células normales, incluyendo miocitos, mientras que mutaciones del mismo se asocian con enfermedades de los músculos esquelético y cardíaco. Además, la proteína BAG3 se expresa en muchos tipos de tumores primarios o líneas de células tumorales (leucemias linfóide o mieloide, neuroblastoma, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, cáncer de mama y de próstata, melanoma, osteosarcoma, glioblastoma y tumores del riñón, colon y ovario). En tipos celulares normales, tal como leucocitos, células epiteliales y de glía y células de la retina, la expresión del gen bag3 se puede inducir por agentes estresantes, tal como oxidantes, altas temperaturas, falta de suero, metales pesados, infecciones por VIH-1, etc. Estos datos indican que la regulación de la expresión del gen bag3 es un componente importante en la respuesta celular a estrés y está correlacionada con la presencia de elementos que responden a HSF1 (factor de transcripción de choque térmico 1), que se activa en varias formas de estrés celular en el promotor del gen BAG3 (Franceschelli S., et al. J Cell Physiol 215 (2008) 575-577).

25 Además, debido a la presencia de muchos dominios de interacción proteína-proteína en la estructura de la misma, la proteína BAG3 influye en la supervivencia celular en diferentes tipos de células, al interactuar con diferentes compañeros moleculares (A. Rosati et al. Biochim Biophys Acta. 2012; 1826:365-9).

30 El primer mecanismo descrito en relación a la actividad antiapoptótica de BAG3 se identificó en células de osteosarcoma y melanoma, donde se observó que la proteína BAG3 modula la activación del factor de transcripción NF-κB y la supervivencia celular (Ammirante M. et al., Proc Natl Acad Sci USA 107 (2010) 7497-7502). Se ha descrito un mecanismo molecular diferente en células de glioblastoma, donde la proteína BAG3 coopera de una manera positiva con la proteína HSP70 para mantener la proteína BAX en el citosol y prevenir la translocación de la misma a las mitocondrias (Festa M. et al., Am J Pathol 178 (2011) 2504-25). Por último, en algunos tumores, se ha mostrado que BAG3 regula proteínas que modulan la adhesión celular.

35 La presencia de la proteína BAG3 citoplásmica también se ha descrito en muchos sistemas celulares diferentes y se ha asociado, no solo con varios tumores, sino también en enfermedades en general relacionadas con la supervivencia celular.

40 Se ha demostrado recientemente que la proteína BAG3 puede ser secretada por ciertas células, en particular por células de adenocarcinoma pancreático y por cardiomiocitos cuando se someten a una agresión oxidativa (Rosati et al., Am J Pathol. Nov 2012;181(5):1524-9; De Marco et al. Cell Death Dis. 2013; 4:e495.). La solicitud de patente no. WO2011/067377 describe proteína BAG3 soluble, es decir, dicha proteína cuando es secretada por las células, como un marcador bioquímico en suero, que es muy específico para el diagnóstico de ciertas afecciones patológicas, tal como enfermedades cardíacas y tumor del páncreas. En particular, se ha demostrado que, en pacientes que padecen adenocarcinoma pancreático, la concentración de BAG3 soluble en general es mayor de 10 ng/ml, significativamente mayor que en el suero de individuos sanos. Además, se ha descrito recientemente que la proteína BAG3 se expresa en 346/346 pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) y es liberada por las células del tumor del páncreas, pero tal proteína no se expresa ni en los tejidos no neoplásicos circundantes ni en un páncreas normal; asimismo, se ha descrito que los niveles de expresión de BAG3 están relacionados con la supervivencia del paciente. En particular, se ha demostrado que la proteína BAG3 secretada por las células tumorales en el páncreas induce la activación de macrófagos y la producción, mediante ello, de moléculas que apoyan el crecimiento neoplásico y, en el corazón, son responsables, después de un suceso isquémico, de la fagocitosis de los miocitos dañados y de la sustitución del miocardio necrótico con tejido cicatricial y el consecuente remodelado del tejido.

55 La solicitud de patente no. MI2013A000403 también describe cómo la inhibición de la proteína BAG3 mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-BAG3 altera el desarrollo de tumores pancreáticos. En efecto, al interferir con la unión de BAG3 a macrófagos, mediante un anticuerpo monoclonal anti-BAG3, la activación de los macrófagos y el crecimiento tumoral se inhiben. El tratamiento con anticuerpos anti-BAG3 representa una nueva herramienta terapéutica, más eficaz para el tratamiento de tumores del páncreas.

60 Como se sabe, los tratamientos de quimioterapia convencionales para enfermedades tumorales, así como tratamientos de enfermedades inflamatorias e inmunitarias con corticosteroides o AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos) plantea numerosos inconvenientes ligados a efectos secundarios y no hay, actualmente, medios definitivos de tratar tales enfermedades.

Por tanto, hay una necesidad evidente para un tratamiento terapéutico nuevo y mejorado que tiene la ventaja que ser muy específico y que tenga pocos o de hecho ningún efecto secundario, en comparación con las terapias convencionales, comúnmente conocidas usadas para el tratamiento de las enfermedades de una naturaleza inmunitaria, inflamatoria, cardíaca y neoplásica descritas en la presente invención.

5

Divulgación de la invención

Estudios posteriores han identificado receptores de membrana expresados en macrófagos, que son responsables de la unión de la proteína BAG3 a la superficie de los mismos y de la activación de los mismos. Mediante esta identificación, se pueden diseñar moléculas de unión al receptor de BAG3, tal como moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y/o fragmentos de los mismos, que interfieran específicamente con la unión entre la proteína BAG3 y el receptor de la misma.

10

Tal bloqueo selectivo del ligando BAG3 al receptor del mismo, por tanto, permite que se obtenga una mayor eficacia en el tratamiento de las células diana y mayor especificidad, que trae consigo una reducción en los efectos secundarios de los tratamientos no específicos convencionales.

15

Por tanto, se demostró sorprendentemente, por primera vez, que la inhibición de la unión de la proteína BAG3 a los receptores de membrana de la misma, presentes en la superficie de células diana, mediante el uso de moléculas de unión al receptor de BAG3, inhibe la activación de macrófagos y que este proceso es responsable del efecto positivo de BAG3 sobre el crecimiento neoplásico.

20

El tratamiento con las moléculas de unión al receptor de BAG3, por tanto, representa una herramienta terapéutica nueva y mejorada para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, así como otras enfermedades ligadas a la activación de macrófagos, tal como enfermedades de una naturaleza inflamatoria, inmunitaria, cardíaca y degenerativa.

25

El receptor específico para la proteína BAG3 identificado mediante los estudios descritos por los inventores del presente documento está compuesto de dos proteínas, es decir, IFITM-2 (proteína transmembrana inducida por interferón 2) y NRP-1 (neuropilina-1).

30

IFITM2 se ha descrito como una proteína de membrana que se induce por interferón y está implicada en la regulación de infección vírica. Hasta este momento, el papel de la misma como receptor para ligandos fisiológicos era desconocido. La parte extracelular de IFITM-2 contiene un motivo rico en prolina del tipo PPxY (número de registro de UniProt para IFITM-2 humana: Q01629; secuencia desde el aa 16 al aa 19 PPNY), que está definido como un sitio con afinidad de unión particularmente con el dominio WW de BAG3 (Ulbricht A. et al. *Curr Biol.* 2013; 23 (5) :430-5).

35

Además, cuando se investigaron otros putativos dominios de la parte extracelular de IFITM-2, se identificaron dos dominios SH3 (www.expasy.org). Los dominios SH3 se han identificado como potenciales interactores de los dominios ricos en prolina de la proteína BAG3 (A. Rosati et al. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1826:365-9).

40

Además, el documento WO2004016643 divulga el uso de IFITM-2 como una vacuna antitumoral. En particular, entre los diferentes AAT identificados en el mismo, el documento divulga tres péptidos que tienen de 8 a 10 aminoácidos derivados de la proteína transmembrana inducida por interferón 2 (IFITM2) 1-8D, que son capaces de fomentar la unión eficaz a moléculas de MHC de clase I para provocar respuestas de LTC, tal como a un cáncer de colon o próstata.

45

NRP-1 (neuropilina-1) es una cadena no específica (correceptor) de varios tipos de receptores, tal como receptores para semaforina de clase 3, receptores para miembros de la familia VEGF (VEGF-A, B, C,D y E), factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), factor de crecimiento de hepatocitos (HG), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). En estos receptores, NRP-1 participa en la unión y amplifica la transducción de señales.

50

Se mostró en el documento WO2009/036149 que cuando la proteína VEGF-B se une al receptor VEGFR-1 y al correceptor del mismo, NRP-1 actúa como un inhibidor de apoptosis en la retina y en el cerebro.

55

También se ha descrito que bloquear la unión de la proteína VEGF-A al correceptor NRP-1 atenúa la fosforilación del receptor VEGFR2 y la migración de células endoteliales (Jarvis A et al., *J. of Medicinal Chemistry* 53, p. 2215-2226 (2010). Por tanto, dependiendo del receptor con el que interacciona, el correceptor NRP-1 desempeña un papel versátil en angiogénesis, orientación de axones, supervivencia celular, apoptosis, migración y en invasión celular.

60

En particular, en el caso que NRP-1 muestra actividad de correceptor en relación con IFITM-2 mediante la señal activada por la proteína BAG3 extracelular, se observa inducción de la liberación de IL-6 en macrófagos, junto con niveles aumentados de proteínas relacionadas con la activación del proceso inflamatorio, tal como iNOS y COX-2.

65

Por tanto, el tratamiento con cualquier molécula capaz de inhibir específicamente, la unión de la proteína BAG3 a los macrófagos mediante una interacción específica con el receptor de BAG3 resulta particularmente eficaz en el tratamiento de esas enfermedades caracterizadas por la activación de macrófagos, tal como enfermedades neoplásicas y enfermedades de una naturaleza inflamatoria, inmunitaria, cardíaca o degenerativa. En efecto, estas moléculas de unión al receptor de BAG3 son capaces tanto de unirse como de bloquear la unión de la proteína BAG3 al receptor expresado por los macrófagos de una manera muy selectiva y dirigida, y por tanto de impedir los efectos patológicos relacionados con la proteína BAG3.

En particular, el uso de las moléculas de unión al receptor de BAG3 anteriormente mencionadas en este tratamiento tiene la ventaja sorprendente de ser más específico para estados de enfermedad seleccionados caracterizados por la sobreexpresión y liberación de proteína BAG3, y también menos dañinos en términos de efectos secundarios.

Una forma de realización de la presente invención es, por tanto, el uso de dichas moléculas de unión al receptor de BAG3 en el tratamiento de cáncer pancreático, caracterizado en que dichas moléculas se unen a la proteína IFITM-2 y se seleccionan de anticuerpos y/o fragmentos de los mismos.

Una forma de realización adicional de la presente invención es, por tanto, el uso de dichas moléculas de unión al receptor de BAG3 expresado en la superficie de los macrófagos en el tratamiento de cáncer pancreático.

Dichas moléculas de unión al receptor de BAG3 utilizables según la presente invención se seleccionan de anticuerpos y/o fragmentos de los mismos.

Según un aspecto preferido de la presente invención, dichas moléculas de unión al receptor de BAG3 se caracterizan por el hecho de que tales moléculas no son proteínas de la familia VEGF.

Aún más preferiblemente, dichas moléculas de unión al receptor de BAG3 pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos recombinantes, anticuerpos conjugados, fragmentos scFv (diacuerpo, triacuerpo y tetracuerpo), fragmentos Fab y fragmentos F(ab')₂.

En un aspecto preferido de la invención, dichos anticuerpos son anticuerpos anti-IFITM-2. El término "moléculas pequeñas" se refiere a una serie de moléculas pequeñas biológicamente activas con bajo peso molecular, tal como moléculas identificadas por cribado de alto rendimiento de bibliotecas combinatorias, fragmentos de anticuerpos, péptidos, péptidos químicamente modificados, moléculas orgánicas, oligómeros, y fragmentos de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNi), que tienen una función terapéutica ya que son capaces de unirse a una diana patológica específica apropiadamente identificada. Algunos ejemplos de moléculas pequeñas son los conocidos inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) Gefitinib y Erlotinib, que inhiben EGFR en pacientes con tumores del pulmón, o el anticuerpo monoclonal anti-ERBB2 Trastuzumab, que se usa en el tratamiento de tumores de mama positivos para ERBB2, y numerosos otros ejemplos (Hoelder S et al., *Molecular Oncology* 6, p. 155176 (2012)). Un ejemplo de identificación de una molécula pequeña específica de ligando para el receptor NRP1 de VEGF-A se describe en la bibliografía (Jarvis A et al., *J of Medicinal Chemistry* 53, p. 2215-2226 (2010)).

El término "anticuerpo policlonal" se refiere a una mezcla de anticuerpos que son genéticamente diferentes ya que están producidos por diferentes células plasmáticas y que reconocen un epítipo diferente del mismo antígeno.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un conjunto de anticuerpos que son todos idénticos ya que están producidos por líneas celulares a partir de un solo tipo de célula inmunitaria (es decir, un clon celular).

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo de origen humano, cuya región hipervariable se ha sustituido por la región homóloga de anticuerpos monoclonales no humanos.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene porciones derivadas de diferentes anticuerpos.

El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo obtenido usando métodos de ADN recombinante.

El término "anticuerpo conjugado" se refiere a anticuerpos conjugados con fármacos, toxinas, sustancias radioactivas u otros agentes.

El término "fragmento scFv" (fragmento variable monocatenario) se refiere a fragmentos de inmunoglobulinas solo capaces de unirse con el antígeno afectado. Los fragmentos scFv también se pueden sintetizar en dímeros (diacuerpos), trímeros (triacuerpos) y tetrámeros (tetracuerpos) usando enlazadores peptídicos.

Los términos "fragmento Fab" (fragmento de unión al antígeno) y "fragmento "Fab2" se refieren a fragmentos de inmunoglobulinas que consisten en una cadena ligera unida al fragmento Fc de la cadena pesada adyacente, y tales fragmentos son anticuerpos monovalentes. Cuando las porciones Fab están en pares, el fragmento se llama Fab2.

También se divulga el uso de las moléculas de unión al receptor de BAG3 anteriormente mencionadas en el tratamiento de un estado de enfermedad particular que implica la activación de macrófagos. Tal estado de enfermedad se puede seleccionar de: enfermedades neoplásicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardíacas, enfermedades inmunitarias o enfermedades degenerativas.

5 Preferiblemente, tales enfermedades neoplásicas se pueden seleccionar de cáncer pancreático.

10 Preferiblemente, dichas enfermedades inflamatorias se pueden seleccionar de enfermedades relacionadas con la inflamación de la piel, los nervios, huesos, vasos sanguíneos, y tejidos conjuntivos, y más preferiblemente, psoriasis, artritis, neuritis, conectivitis.

Preferiblemente, dichas enfermedades cardíacas se pueden elegir de angina de pecho, infarto de miocardio, isquemia, síndrome coronario agudo e insuficiencia cardíaca aguda y crónica.

15 Preferiblemente, dichas enfermedades inmunitarias se pueden elegir de enfermedades autoinmunitarias tal como enfermedades reumáticas, enfermedades del tejido conjuntivo, enfermedades neuromusculares, enfermedades endocrinas, enfermedades gastrointestinales, enfermedades de la sangre, enfermedades de la piel, y vasculitis, y más preferiblemente, artritis reumatoide, esclerosis múltiples, conectivitis, lupus eritematoso, endometriosis, y colitis ulcerosa. Preferiblemente, dichas enfermedades degenerativas se pueden elegir de enfermedades neurodegenerativas y enfermedades degenerativas musculares, y más preferiblemente enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y distrofia muscular.

25 Se divulga el uso de las moléculas de unión al receptor de BAG3 anteriormente mencionadas, en asociación con al menos un anticuerpo anti-BAG3, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial.

Según una divulgación preferida, las moléculas de unión al receptor de BAG3 anteriormente mencionadas en asociación con al menos un anticuerpo anti-BAG3, se usan en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardíacas, enfermedades inmunitarias o enfermedades degenerativas.

30 En un aspecto de la presente invención, dichas moléculas de unión al receptor de BAG3 se pueden administrar a seres humanos.

35 Un aspecto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer pancreático, que comprende al menos una molécula de unión al receptor de BAG3 en asociación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, caracterizado en que dichas moléculas de unión al receptor de BAG3 son anticuerpos anti-IFITM-2.

40 Un objeto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer pancreático, que contiene al menos un anticuerpo anti-IFITM-2 y al menos un anticuerpo anti-BAG3 como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial.

También se divulga el uso de dicha composición como un medicamento.

45 Se divulga el uso de la composición anteriormente mencionada en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardíacas, enfermedades inmunitarias o enfermedades degenerativas.

La composición para uso según la presente invención se puede formular en una forma adecuada para la administración oral o en una forma adecuada para la administración parenteral o tópica.

50 En una divulgación preferida, dicha forma oral se puede seleccionar de comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones, gránulos y cápsulas oleaginosas.

55 En una divulgación preferida más, dicha forma tópica se puede seleccionar de crema, pomada, bálsamo, solución, suspensión, gotas oculares, ovulo vaginal, solución nebulizadora, spray, polvo o gel.

En una divulgación preferida adicional, dicha forma parenteral se selecciona de una solución tampón acuosa y una suspensión oleaginosas.

60 Dicha administración parenteral se puede seleccionar de administración intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranodal o intraesplénica.

Dicha composición farmacéutica se puede administrar a seres humanos.

65 Los siguientes ejemplos se pretenden solamente para permitir un mejor entendimiento de la invención.

Descripción de los dibujos

Figura 1. P1: precipitados después de centrifugación a 500 g (células enteras); P2: precipitados después de centrifugación a 15.000 g (ER, mitocondrias, núcleos); P3: precipitados después de centrifugación a 100.000 g (membranas plasmáticas); S3: sobrenadantes después de centrifugación a 100.000 g. Los resultados se obtuvieron mediante un anticuerpo anti-penta His conjugado a HRP, que se usó para resaltar la presencia de proteína recombinante BAG3.

Figura 2. La figura 2 muestra que, en ausencia de tratamiento de las células J774 con la proteína recombinante BAG3, no se detecta proteína usando un anticuerpo anti-His. La purificación de los complejos de proteína recombinante que contienen BAG3 de las membranas plasmáticas solubilizadas preparadas después de incubación de rBAG3 con las células J774 muestra que no se observó la presencia de rBAG3 en la muestra rechazada (FT) y asimismo en las fracciones de lavado. Esto confirma la unión específica de rBAG3 a la resina Ni-NTA y que la rigurosidad de los tampones de lavado asegura la especificidad de unión, así como que rBAG3 se eluye por completo en las dos primeras fracciones con la solución de imidazol 250 mM. Las proteínas totales obtenidas en las fracciones de elución se determinaron después de precipitación con TCA.

Leyenda. FT muestra no unida a la resina; L5-1 L5-2 fracciones de lavado con imidazol 5 mM, L10-1, L10-2, L10-3, fracciones de lavado con imidazol 10 mM; E250-1, E250-2, E250-3 fracciones de elución con imidazol 250 mM. Los resultados se obtuvieron mediante un anticuerpo anti-penta His conjugado a HRP usado para resaltar la presencia de proteína recombinante BAG3.

Figura 3. Los niveles de NRP-1 e IFITM-2 se midieron con la técnica de inmunotransferencia en células control J774, transfectadas con un ARNip no específico (mzcl) o con un ARNip específico de NRP-1 o IFITM-2.

Figura 4. Los gráficos muestran el porcentaje de células positivas para fluorescencia obtenidas por citometría de flujo a partir de células incubadas con proteína recombinante BAG3 unida a FITC. Las muestras ctr y mzcl representan el porcentaje de células control o células transfectadas con un ARNip no específico (mzcl) que se une a BAG3 recombinante. Este porcentaje disminuye después de la transfección con los ARNip específicos de NRP-1 o IFITM-2 o con los dos ARNip cotransfectados. Las barras muestran el porcentaje de células que mostraron positivo para unión con BAG3 unida a FITC + desviación estándar. *** $p < 0,001$ frente a mzcl.

Figura 5. Los gráficos muestran que la disminución de los receptores de membrana, NRP-1, IFITM-2, o ambos produce una disminución drástica en la liberación de IL6, después de estimulación con proteína rBAG3.

Figura 6. El gráfico muestra que la presencia de anticuerpo contra IFITM-2 (Código H00010581M14 Novus Biologicals, Littleton, CO, EE UU) produce una disminución del 53,4% en la unión de BAG3-FITC a la superficie celular (C). *** $p < 0,001$.

Figura 7. El gráfico en la figura muestra que, a una concentración de 10 ng/ml, la proteína recombinante aumenta la producción de nitrito en el 200% en comparación con el control ($p < 0,001$) y que la actividad de la misma es dependiente de la dosis.

Figura 8. Las imágenes de microscopía de fluorescencia demuestran la unión de la proteína BAG3 a la superficie celular de células J774 mediante conjugación de la proteína recombinante con un fluoróforo.

Figura 9. Las imágenes de microscopía de fluorescencia demuestran que la proteína BAG3 a la superficie de macrófagos y no células de músculo de corazón (HCM) o células de adenocarcinoma pancreático (PANC-1).

Figura 10. Mediante análisis de citometría de flujo, se observó que FITC-BAG3 se une a los macrófagos de la línea celular J774.

Figura 11. Se puede observar en la figura que los niveles de enzimas COX-2 e iNOS aumentaron después de tratamiento de las células con rBAG3.

Figura 12. Se puede observar en la figura que BAG3 induce la liberación de nitrito, lo que confirma que los macrófagos se activaron en respuesta a la unión con la proteína.

Figura 13. Esta figura demuestra que BAG3 induce la liberación de interleuquina-6 (IL-6), lo que confirma que los macrófagos se activaron en respuesta a la unión con la proteína.

Ejemplos

Ejemplo 1. Fraccionamiento de membranas, extracción y solubilización de complejos que contienen proteína recombinante BAG3 (rBAG3)

Se descongelaron dos grupos de 20 millones de macrófagos (línea celular J774) en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron 3 veces en 10 ml de PBS 1X frío, que contenía una solución de inhibidores de proteasa 1X (PIC

1X, Roche) a pH 8,0. Las células se resuspendieron después en 25 ml de PBS 1X y se incubaron con 25 µg de proteína recombinante BAG3 (1 µg/ml) durante una hora a 4°C. La muestra de células usada para el control negativo se incubó en las mismas condiciones sin la proteína recombinante BAG3. Las células se lavaron posteriormente 3 veces en 10 ml de PBS 1X frío para eliminar la proteína en exceso. Los precipitados finales se resuspendieron en 5 ml de PBS 1X, PIC 1X, pH 8,0, y se lisaron mecánicamente en hielo usando un homogenizador Dounce. Las membranas se fraccionaron por centrifugación secuencial como sigue: 500 g durante 5 min a 4°C, 15.000 g durante 30 minutos a 4°C, y 100.000 g durante una hora a 4°C. La fracción de membrana plasmática (precipitados obtenidos después de la centrifugación a 100.000 g) se resuspendió en 200 µl de PBS 1X, PIC 1X, pH 8,0 y se solubilizó.

Las muestras se centrifugaron a 100.000 g durante una hora a 4°C. Los precipitados y los sobrenadantes se desnaturalizaron con SDS al 2%. Las proteínas se separaron con SDS-PAGE y se inmovilizaron en una membrana de PVDF. Se usó un anticuerpo anti-penta His conjugado a HRP para resaltar la presencia de proteína recombinante BAG3 que contiene este tipo de etiqueta. La figura 1 confirma que la proteína recombinante rBAG3 es capaz de unirse a compañeros proteicos presentes en la membrana plasmática.

Ejemplo 2. Purificación de complejos que contienen proteína recombinante BAG3 (rBAG3) mediante cromatografía de afinidad

Las proteínas obtenidas de la fracción de la membrana plasmática se diluyeron mediante la adición de 200 µl de solución que contenía DDM al 0,2%, PBS 1X, PIC 1X, a pH 8,0 y se dializó en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer (MWCO 10.000, capacidad 0,1-0,5 ml, Pierce) en 400 ml de tampón de diálisis (DDM al 0,1%, PBS 1X, PIC 1X, imidazol 5 mM, pH 8,0) durante 1 h a 4°C. Después de cambiar el tampón, la diálisis se realizó durante la noche. Se añadieron 25 µl de resina Ni-NTA equilibrada en tampón de unión (DDM al 0,1%, PBS 1X, PIC 1X, imidazol 5 mM a pH 8,0) a las muestras dializadas y se incubaron con agitación a 4°C. Después de centrifugación a 1000 g durante 10 segundos, los sobrenadantes se eliminaron. Las resinas se lavaron dos veces con 4 volúmenes de tampón de unión (100 µl) y se lavaron tres veces con 4 volúmenes de tampón de lavado (DDM al 0,1%, PBS 1X, PIC 1X, imidazol 10 mM, a pH 8,0). Las proteínas unidas se eluyeron con 3x2 volúmenes (50 µl) de tampón de elución (DDM al 0,1%, PBS 1X, PIC 1X, imidazol 250 mM, a pH 8,0). Cada fracción obtenida de la purificación se analizó con SDS-PAGE y posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF, seguido por inmunodetección con un anticuerpo anti-penta His conjugado a HRP. Las segundas fracciones eluidas se agruparon y concentraron con ácido tricloroacético (TCA). Las proteínas se precipitaron durante 2 horas en hielo con TCA al 20% frío. Después de centrifugación los precipitados se lavaron s fondo 3 veces con acetona fría. Los precipitados finales se resuspendieron con 5 µl de guanidina 8 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Este tampón permite la solubilización de todas las proteínas precipitadas y es compatible con análisis por espectrometría de masas. La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

La figura 2 muestra que, en ausencia de tratamiento de las células J774 con la proteína recombinante BAG3, no se detecta proteína usando un anticuerpo anti-His. La purificación de los complejos de proteína recombinante que contienen BAG3 a partir de las membranas plasmáticas solubilizadas preparadas después de incubación de rBAG3 con las células J774 muestra que no se observó la presencia de rBAG3 en la muestra rechazada (FT) y asimismo en las fracciones de lavado. Esto confirma la unión específica de rBAG3 a la resina Ni-NTA y que la rigurosidad de los tampones de lavado asegura la especificidad de unión, así como que rBAG3 se eluye por completo en las dos primeras fracciones con la solución de imidazol 250 mM. Las proteínas totales obtenidas en las fracciones de elución se determinaron después de precipitación con TCA.

Ejemplo 3. Análisis por LC-MSMS de los complejos que contienen la proteína recombinante BAG3

Después de reducción con DTT 15 mM durante 45 minutos a 55°C, 3,5 µg de la muestra se alquilaron con yodoacetamida 50 mM durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se realizó digestión con tripsina durante 18 horas a 37°C. La muestra se secó después con una Speed-Vac y por último se resuspendió en 10 ml de TFA al 0,3%. Las muestras se sometieron a digestión después de ser preconcentradas usando una columna capilar C18 Acclaim Pep Map 100 (5 micrómetros, 100A, 300 µm x 5 cm, Dionex) con una solución que contenía TFA al 0,05%, H₂O/ACN 98/2. Los péptidos se separaron después usando una C18 Acclaim Pep Map 100 (3 µm, 100A, 75 µm x 15 cm, Dionex) con un tampón de ácido fórmico al 0,1% H₂O/ACN 10/80, 0,1%. La espectrometría de masas en tándem (MSMS) se realizó con un LTQ Velos (Thermo Scientific). Los datos se analizaron con el software Proteome Discoverer 1.1 (algoritmo MASCOTTE v2.2.4), usando la base de datos Swiss-Prot (UniProtKB, v12/2012). La tabla 1 muestra las proteínas de membrana plasmática copurificadas en complejo con rBAG3. En particular, tales membranas incluían dos moléculas receptoras: la proteína transmembrana inducida por interferón 2 (IFITM-2) y neuropilina-1 (NRP-1). Por primera vez, por tanto, se han identificado receptores de la membrana plasmática para BAG3 mediante un enfoque proteómico. Mediante este proceso, se han identificado 9 nuevos compañeros de BAG3 incluyendo 2 receptores que están implicados en la unión con BAG3 extracelular. Los compañeros identificados están implicados en varios procesos biológicos tal como remodelación de membrana, apoptosis, y desarrollo y modulación del sistema inmunitario. En particular, el receptor IFITM-2 está implicado en los procesos de regulación de apoptosis, mientras que NRP-1 desempeña un papel en angiogénesis, trombopoyesis, y el desarrollo del sistema cardiovascular.

Tabla 1. Proteínas de membrana plasmática copurificadas en complejo con rBAG3

Nombre del gen	Número de registro
Proteína asociada a adenilato ciclasa 1	P40124
Cadena pesada de clatrina 1	Q68FD5
Coactivador constitutivo de la proteína similar a PPAR gamma 1	Q6A0A9
Glucoproteína-N-acetilgalactosamina-3-beta-galactosiltransferasa 1	Q9JJ06
Cadena alfa D-D, antígeno de histocompatibilidad H2 Clase I	P01900
Cadena alfa K-D, antígeno de histocompatibilidad H2 Clase I	P01902
Proteína transmembrana inducida por interferón 2	Q99J93
Región Fc del receptor de inmunoglobulina de baja afinidad IIc	P08101
Neuropilina 1	P97333

Ejemplo 4. Modulación negativa de los niveles de NRP-1 e IFITM-2 en células J774

5 Se sembraron células J774 en una placa de 24 pocillos al 40% de confluencia, y después de 24 horas se transfectaron usando ARNip específicos capaces de modular negativamente los niveles de NRP-1 e IFITM-2. Los ARNip para NRP-1 y para IFITM-2 se obtuvieron de Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EE UU) y se usaron para transfección con Transfectin (BIORAD, Carlsbad, EE UU) a una concentración final de 100 nM. Después de 72 horas, las células se recogieron y lisaron. Las proteínas totales se analizaron después por separación en SDS-PAGE y los niveles de los dos receptores identificados se analizaron después con inmunotransferencia e hibridación con dos anticuerpos específicos. La figura 3 muestra una expresión constitutiva de ambas proteínas y que los ARNip son capaces de modular su expresión negativamente. Se usó un anticuerpo capaz de marcar la proteína GAPDH para seguir las condiciones de carga en gel idénticas.

Ejemplo 5. Unión de la proteína recombinante BAG3 a las células J774 a través del receptor de superficie

Se transfectaron células J774 con ARNip específicos capaces de modular negativamente los niveles de NRP-1 o IFITM-2 o ambos, como se ha descrito en el ejemplo 4. Los ARNip para NRP-1 e IFITM-2 se obtuvieron de Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EE UU) y se usaron para transfección con Transfectin (BIORAD, Carlsbad, EE UU) a una concentración final de 100 nM. Después de 48 horas, las células se recogieron, se incubaron con tampón de bloqueo (PBS 1X/SBF al 5%) durante 30 minutos a 4°C al que se añadió posteriormente la proteína recombinante BAG3 derivada con molécula de FITC (10 µg/millón de células) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS 1X/SBF al 5%, se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 rpm, se resuspendieron en PBS 1X y se analizaron con citometría de flujo. La figura 4 muestra que la modulación negativa de NRP-1 o IFITM-2 o ambos, trae consigo una drástica disminución en la unión de la proteína recombinante BAG3 a las células. Cuando los ARNip usados son capaces de modular negativamente los niveles de uno de los dos receptores específicos identificados, produce una disminución de aproximadamente el 75% en la unión; esta disminución se mueve al 88% cuando se silencian ambas proteínas.

30 Esto demuestra que ambas cadenas de receptor participan en la unión con BAG3 y que es suficiente silenciar una de ellas para prevenir la unión.

Ejemplo 6. La disminución de NRP-1 e IFITM-2 inhibe la liberación de interleuquina 6 inducida por rBAG3

35 Se sembraron células J774 en una placa de 24 pocillos al 40% de confluencia. Después de 24 horas se transfectaron con ARNip para NRP-1, IFITM-2 o ambos, a una concentración final de 100 nM. Después de 72 horas de silenciamiento, la proteína rBAG3 (6 µg/ml) se añadió al medio de cultivo durante 16 horas y se recogieron 100 µl de medio para el ensayo de interleuquina 6 mediante ELISA.

40 La proteína rBAG3 activa los macrófagos, produciendo mediante ello la liberación aumentada de IL-6.

Se puede observar en la figura 5 que el efecto sobre la secreción de IL-6 específica de BAG3 se suprime drásticamente en las células transfectadas con ARNip específicos para los receptores NRP-1 e IFITM-2. *** p < 0,001 frente a mzcl.

45 Esto confirma que ambas cadenas de receptor participan en la acción de BAG3.

Ejemplo 7. Anticuerpo anti-IFITM-2 que previene la unión de rBAG3 a la superficie celular de células J774

Se demostró después que la unión de la proteína rBAG3 se puede inhibir mediante el uso de moléculas interpuestas entre BAG3 y los receptores de la misma.

Se resuspendieron células J774.A1 en solución de bloqueo (PBS 1X/SBF al 5%) a una densidad de 1 millón/ml durante 30 minutos a 4°C. La muestra se dividió después en tres alícuotas, incubadas respectivamente con: A) BAG3-FITC (5 µg/millón de células) durante 30 minutos; B) IgG de ratón (150 µg/millón de células) durante 30 minutos y BAG3-FITC (5 µg/millón de células) durante 30 minutos más; C) ac IFITM-2 (150 µg/millón de células) (Novus Biologicals) durante

30 minutos y BAG3-FITC (0,5 µg/ml) durante 30 minutos más. Las células se lavaron después dos veces con PBS 1X/SBF al 5%, se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 rpm, se resuspendieron en 300 µl de PBS y se analizaron con citometría de flujo.

5 Como se puede observar en la figura 6, al ocupar los sitios de interacción entre BAG3 y el receptor IFITM-2 usando un anticuerpo monoclonal específico de IFITM-2, se obtiene una disminución muy significativa en la unión de BAG3 a las células J774.

10 IFITM2 constituye una diana particularmente útil para terapia, porque entra en la constitución del receptor para BAG3 y no entra en la de otros receptores que contienen NRP-1.

Ejemplo 8. Caracterización funcional de la proteína BAG3 soluble

15 Se sembraron células J774 en placa al 60% de confluencia y se incubaron durante 24 horas con la proteína recombinante BAG3 a concentraciones de 10, 30, o 100 ng/ml. Se verificó la producción de nitritos en el medio de cultivo usando el reactivo de Gries (sulfanilamida al 1%, naftiletildiamina al 0,1%, ácido fosfórico al 5%) y se midió usando un espectrofotómetro Beckman DU-62 a 550 nM.

20 La proteína BAG3 recombinante se usó después en ensayos de activación de macrófagos para determinar un posible papel de la proteína liberada en el suero en relación con las células sanguíneas. Para este fin, la línea celular de monocitos murinos J774 se trató con la proteína recombinante BAG3 a diferentes concentraciones, usando un agente proinflamatorio, tal como lipopolisacárido (LPS), como control positivo. La activación de los monocitos se midió por un ensayo de nitritos (Figura 7).

25 La unión de la proteína BAG3 a la superficie celular de las células J774 se confirmó después mediante conjugación de la proteína recombinante con un fluoróforo (Figura 8). La proteína recombinante BAG3 se conjugó después a 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 h. Las células se fijaron después con una solución de paraformaldehído al 3,7% y se analizaron con un microscopio confocal Zeiss LSM.

Ejemplo 9. BAG3 secretada por miocitos cardiacos inducidos por estrés o por células tumorales pancreáticas se une específicamente a la superficie de macrófagos

35 Usando proteína BAG3 recombinante unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC), se verificó que la proteína BAG3 se une a la superficie de macrófagos y no a células musculares de corazón (HCM) o células de adenocarcinoma pancreático (PANC-1) (Figura 9).

40 Se realizó análisis de microscopia de fluorescencia confocal para medir la unión de rBAG3-FITC a células HCM, J774 A1 y PANC-1. La proteína recombinante BAG3 y BSA (seroalbúmina bovina) (SIGMA) se conjugaron a FITC usando el kit de conjugación de FITC FluoroTag (SIGMA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron cantidades iguales de rBAG3-FITC y BSA-FITC a las tres líneas celulares en presencia de NaN₃ al 0,1% durante 1 h. Se usó la proteína β-integrina como control positivo. Se analizó la fluorescencia usando un microscopio confocal Zeiss LSM.

Ejemplo 10. FITC-BAG3 se une a los macrófagos de la línea celular J774

45 Se incubaron células J774 A1 (1x10⁶ células/ml) con diferentes concentraciones de proteína BAG3 FITC (7, 14 y 70 nM). Se usó FITC-BSA (70 nM) como un control negativo (gris). La fluorescencia se analizó por citometría de flujo (Figura 10).

50 La unión de BAG3 a macrófagos se puede inhibir específicamente por péptidos específicos de BAG3 o anticuerpos F(ab')₂ específicos de BAG3 (Tabla 2). En particular, las células J774 se incubaron con proteína FITC-BAG3 14 nM y con péptidos específicos de BAG3 625 nM (péptido 1, péptido 2, péptido 3, péptido 4, o un péptido mezclado) o con 420 nM de anticuerpos F(ab') anti-BAG3 (anticuerpos monoclonales de ratón AC1, AC2 y el anticuerpo policlonal producido en conejo TOS2). Se usaron fragmentos F(ab')₂ de IgG de conejo o ratón como un control negativo.

55

Tabla 2

	FITC-rBAG3	FITC-BSA	Ensayos de competición	
	Células positivas % (\pm D.E.)	Células positivas % (\pm D.E.)	Células positivas % (\pm D.E.)	Inhibición %
FITC-rBAG3	15,7 (\pm 0,45)			
FITC-BSA		4,04 (\pm 0,06)		
(FITC-rBAG3)-(FITC-BSA)	11,06 (\pm 0,45)			
FITC-rBAG3 + Pep1			0,18 (\pm 0,05)	98,4
FITC-rBAG3 + Pep2			1,21 (\pm 0,63)	89,1
FITC-rBAG3 + Pep3			5,86 (\pm 0,43)	47,2
FITC-rBAG3 + Pep4			0,68 (\pm 0,20)	93,8
FITC-rBAG3 + Pep Mzcl			12,1 (\pm 0,21)	0,0
FITC-rBAG3 + F(ab') ₂ de IgG de ratón			12,3 (\pm 0,40)	0,0
FITC-rBAG3 + F(ab') ₂ de IgG de conejo			14,7 (\pm 0,20)	0,0
FITC-rBAG3 + F(ab') ₂ de IgG de AC1			4,11 (\pm 0,26)	62,8
FITC-rBAG3 + F(ab') ₂ de IgG de AC2			3,76 (\pm 0,43)	66,0
FITC-rBAG3 + F(ab') ₂ de IgG de TOS2			3,19 (\pm 0,21)	71,1

Ejemplo 11. Efecto de rBAG3 sobre la expresión de iNOS y COX-2

5 Para investigar las consecuencias funcionales de la unión de BAG3 a macrófagos, se ensayó el efecto de la expresión de rBAG3 sobre la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en las células. Se incubaron células J774 al 80% de confluencia con un medio control, BSA, LPS o rBAG3 durante 20 horas. Se añadió polimixina para verificar la presencia de efectos no específicos de endotoxinas aún presentes después de la purificación de la proteína recombinante BAG3. Se analizaron COX-2 e iNOS en lisados celulares por inmunotransferencia.

Ejemplo 12. Análisis de la liberación de nitrito por macrófagos J774 A1 incubados con rBAG3

15 Se incubaron células J774 al 80% de confluencia con un medio control, BSA, LPS o rBAG3 durante 24 horas. Se incubaron 100 μ l de sobrenadante de cada muestra con 100 μ l de reactivo de Griess; se midió la densidad óptica a 550 nm (DO550) con un espectrofotómetro Beckman DU62. La concentración de nitrito se evaluó comparando la DO de la muestra a 550 nm con la de una curva patrón de nitrito de sodio (Figura 12).

Ejemplo 13. Análisis de la liberación de IL-6 por los macrófagos J774 A1 incubados con rBAG3

20 Se incubaron células J774 al 80% de confluencia con un medio control, BSA, LPS o rBAG3 durante 5 horas. Se midió IL-6 en el medio del cultivo celular usando una prueba de ELISA. La concentración de IL-6 se evaluó comparando la DO de la muestra con la de una curva patrón de IL-6 recombinante (Figura 13).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Moléculas de unión al receptor de BAG3 para uso en el tratamiento de cáncer pancreático, **caracterizadas en que** dichas moléculas se unen a la proteína IFITM-2 y se seleccionan de anticuerpos y/o fragmentos de los mismos.
- 10 2. Moléculas de unión al receptor de BAG3 para uso según la reivindicación 1, **caracterizadas en que** dicho receptor se expresa en la superficie de macrófagos.
- 10 3. Moléculas de unión al receptor de BAG3 para uso según cualquiera de las reivindicaciones previas, **caracterizadas en que** dichas moléculas no son proteínas de la familia VEGF.
- 15 4. Moléculas de unión al receptor de BAG3 para uso según la reivindicación 1, **caracterizadas en que** dichos anticuerpos y/o fragmentos de los mismos se seleccionan de anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos recombinantes, anticuerpos conjugados, fragmentos scFv (diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo), fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂.
- 20 5. Moléculas de unión al receptor de BAG3 para uso según la reivindicación 4, **caracterizadas en que** dichos anticuerpos son anticuerpos anti-IFITM-2.
- 25 6. Moléculas de unión al receptor de BAG3 para uso según cualquiera de las reivindicaciones previas, **caracterizadas por** el hecho de que los receptores pretendidos de dicho tratamiento es un ser humano.
- 25 7. Composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer pancreático, que comprende al menos una molécula de unión al receptor de BAG3 en asociación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, **caracterizada en que** dichas moléculas de unión al receptor de BAG3 son anticuerpos anti-IFITM-2.
- 30 8. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 7, que contiene al menos un anticuerpo anti-IFITM-2 y al menos un anticuerpo anti-BAG3, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial.
- 35 9. Composición farmacéutica para uso según las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizada por** estar formulada en una forma adecuada para la administración oral, parenteral o tópica.

Fig. 1

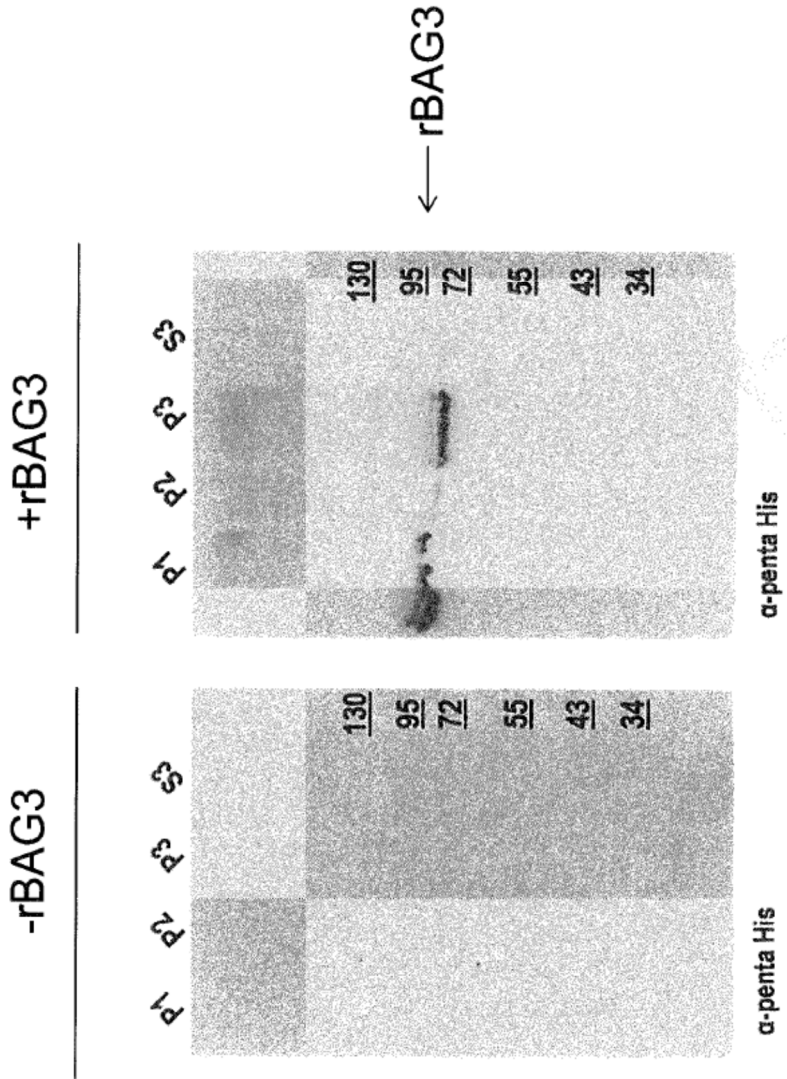


Fig. 2

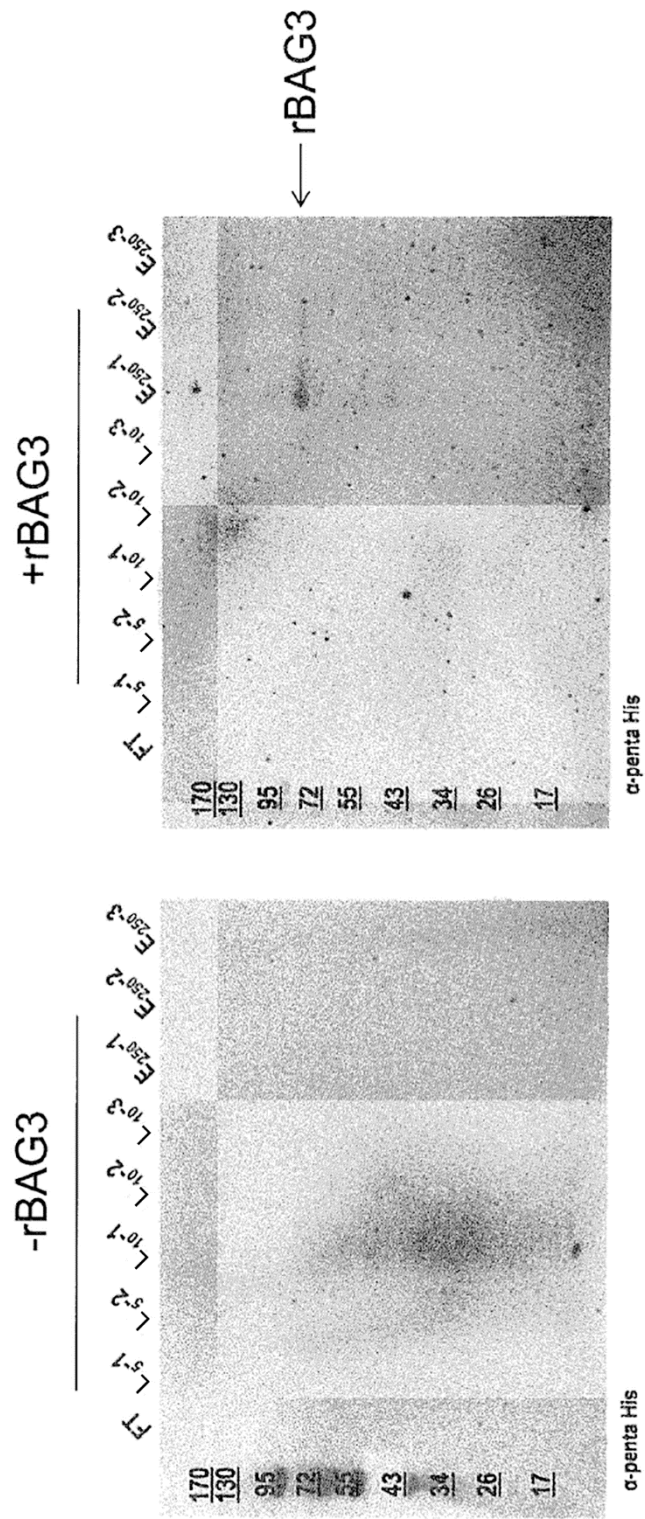


Fig. 3

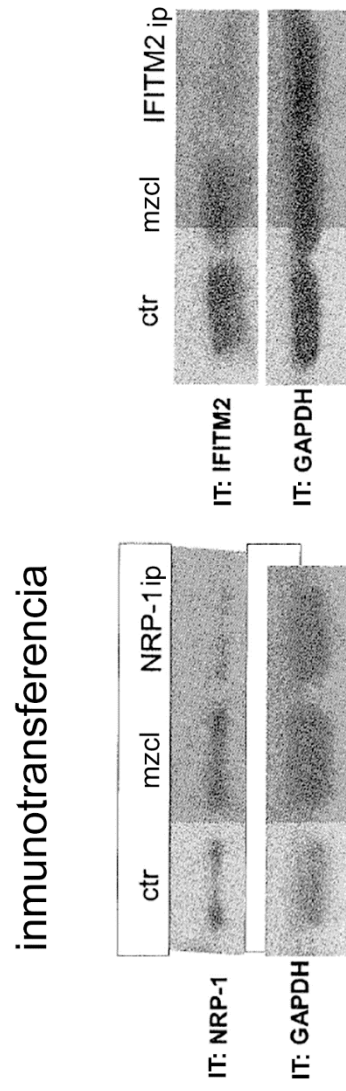


Fig. 4

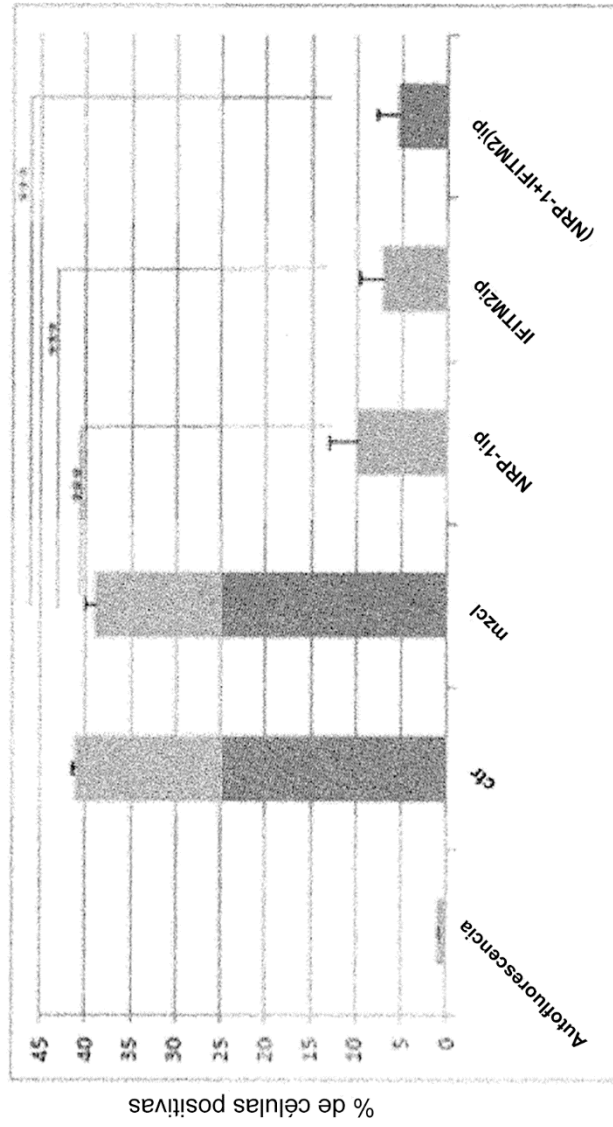


Fig. 5

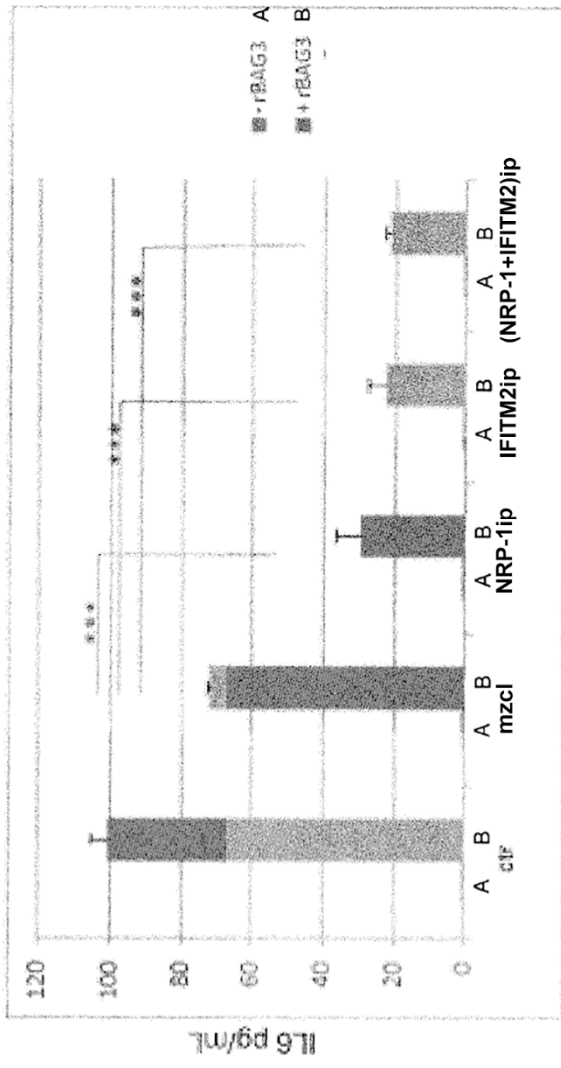


Fig. 6

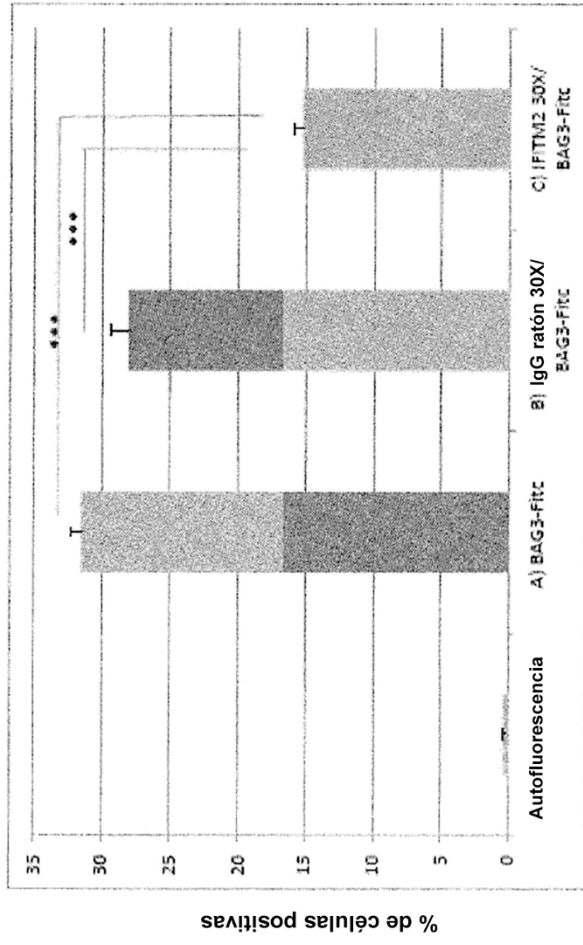


Fig. 7

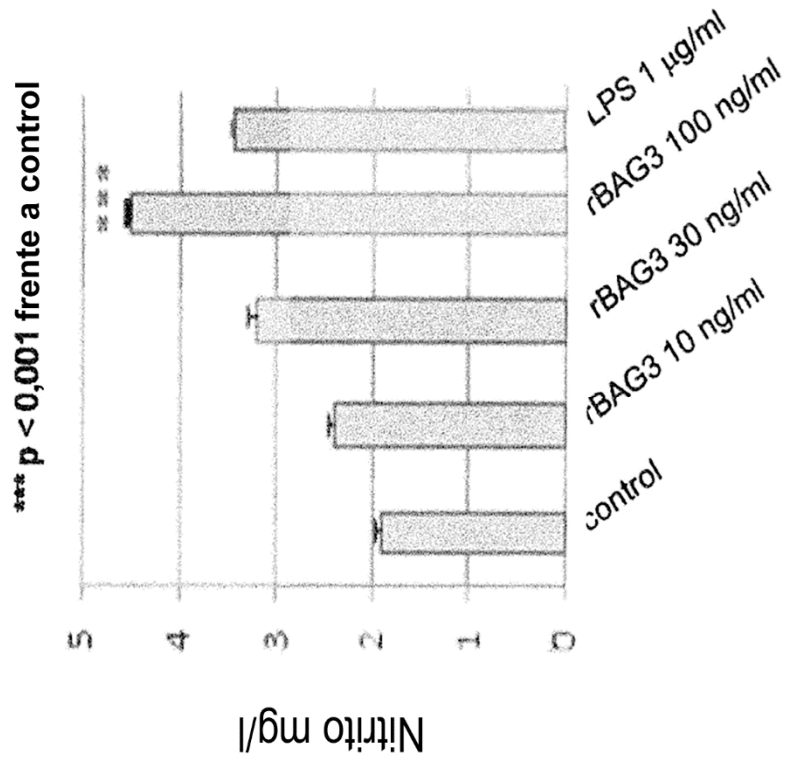


Fig. 8

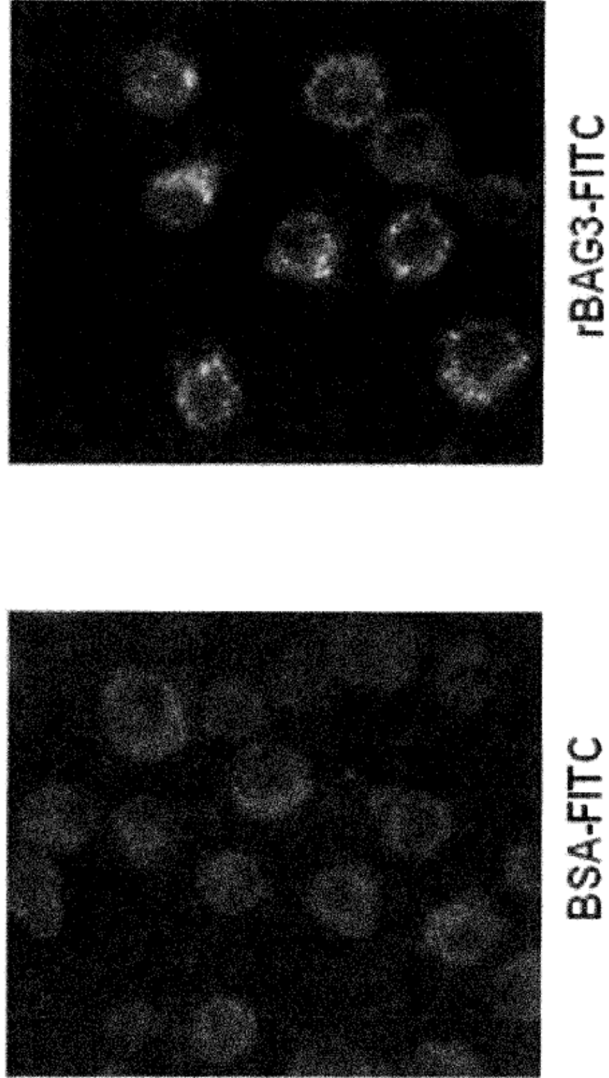


Fig. 9

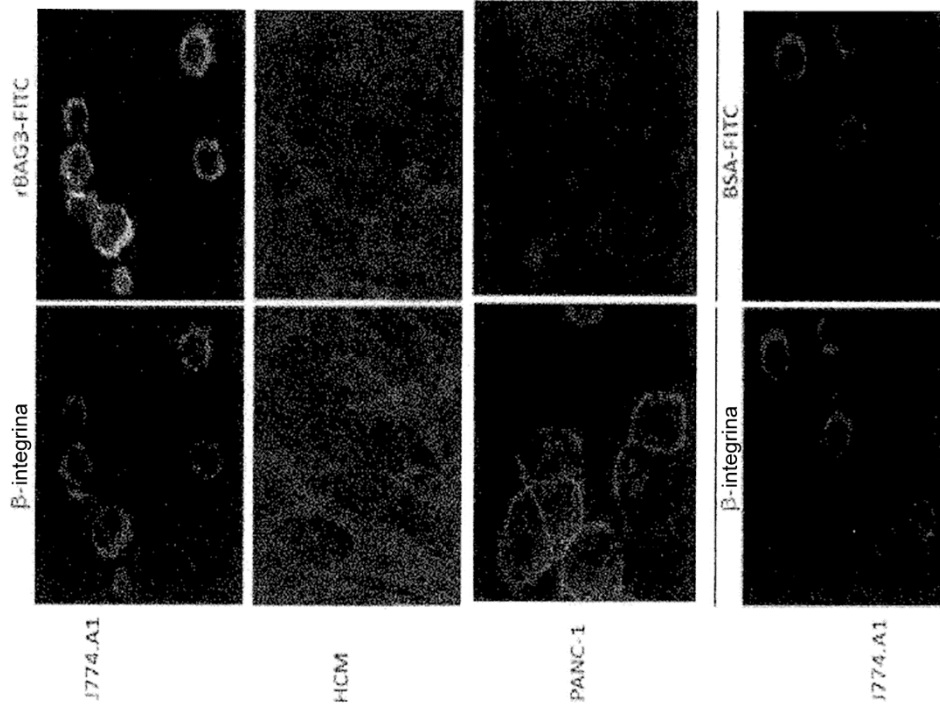


Fig. 10

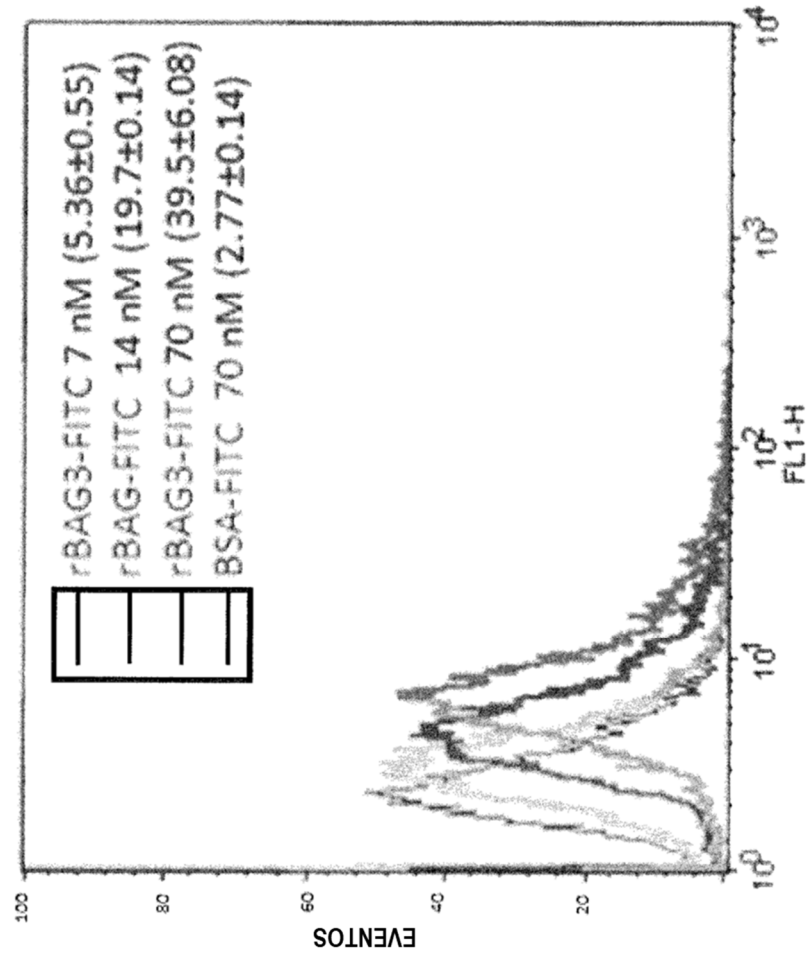


Fig. 11

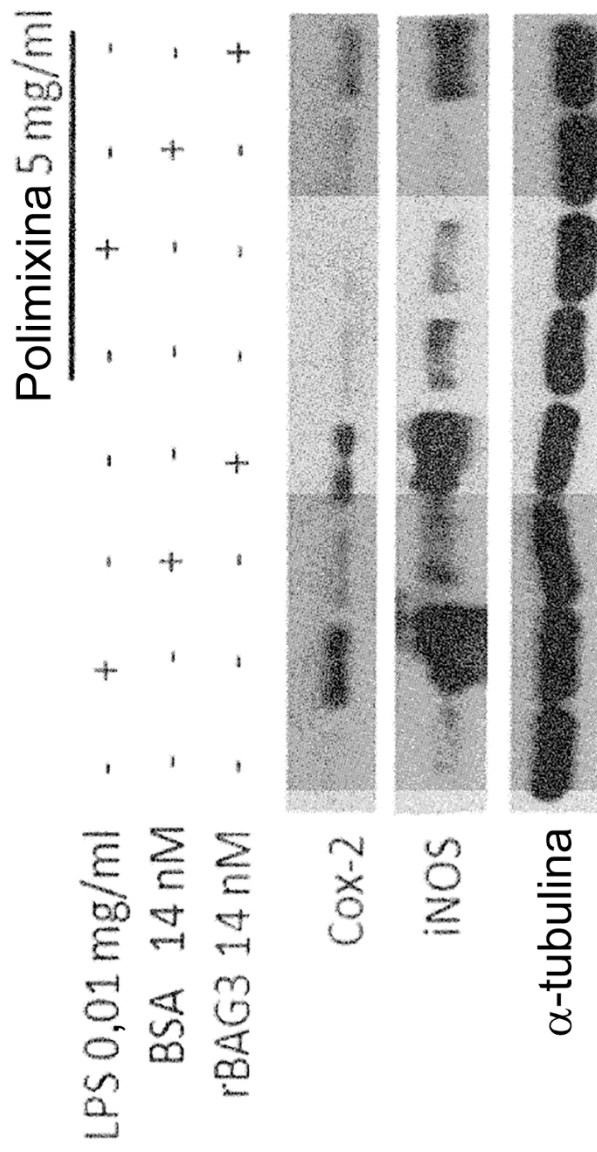


Fig. 12

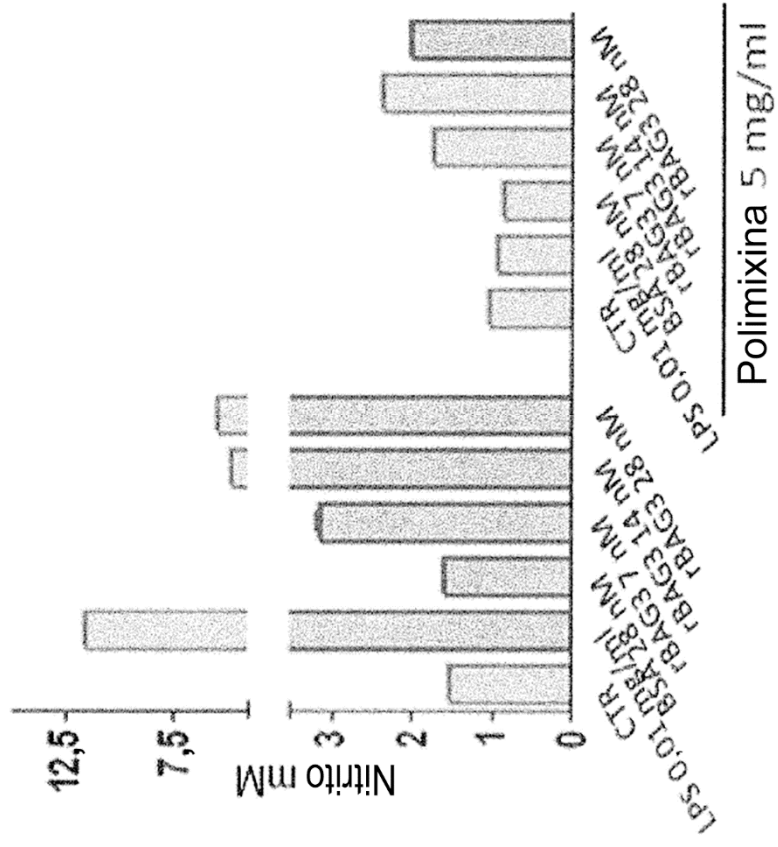


Fig. 13

