

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 947**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2016 PCT/EP2016/076384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17076878**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2016 E 16790978 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3371216**

54 Título: **Anticuerpos humanizados anti-BAG3**

30 Prioridad:

05.11.2015 IT UB20155097

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

02.03.2021

73 Titular/es:

**INTREPIDA BIO, INC. (100.0%)
9920 Pacific Heights Boulevard, Suite 150
San Diego, CA 92121 , US**

72 Inventor/es:

**TURCO, MARIA CATERINA;
ROSATI, ALESSANDRA;
DE LAURENZI, VINCENZO y
SALA, GIANLUCA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 808 947 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados anti-BAG3

5 La presente invención proporciona un anticuerpo humanizado anti-BAG3 o un fragmento del mismo, composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo y su uso como un medicamento, en particular, para uso en el tratamiento de tumores pancreáticos u otras patologías de una naturaleza inmunitaria, inflamatoria, neoplásica, cardiovascular y/o degenerativa.

10 **Estado de la técnica**

La proteína BAG3 es una proteína citoplásmica de 74 kDa que pertenece la familia de co-chaperonas que interaccionan con el dominio ATPasa de la proteína HSP70 (proteína de choque térmico) a través del dominio estructural conocido como el dominio BAG (aminoácidos 110-124). 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, interaccionar con diferentes proteínas.

20 En seres humanos, la expresión del gen bag3 es constitutiva para 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 cáncer de próstata, melanoma, osteosarcoma, glioblastoma y tumores del riñón, colon, ovario, etc.) (Rosati A. et al., 2011).

25 En tipos celulares normales, tal como leucocitos, células epiteliales y células 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 hallazgos 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 al factor de transcripción HSF1 (factor de transcripción de choque térmico), que se activa en varias formas de estrés celular en el promotor del gen bag3 (Franceschelli S., et al., 2008).

30 Además, debido a la presencia de muchos dominios de interacción proteína-proteína en la estructura de la misma, la proteína BAG3 influye la supervivencia celular en diferentes tipos de células, al interaccionar con diferentes compañeros moleculares (Rosati A. et al., 2011). 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., 2010). 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., 2011). 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 patologías en general relacionadas con la supervivencia celular.

40 Además, la solicitud de patente no. WO2011/067377 describe la proteína BAG3 extracelular, secretada por algunos tipos de células, como un marcador bioquímico en suero, que es muy específico para el diagnóstico de ciertos estados patológicos, tal como patologías cardíacas y tumor pancreático.

45 Se ha descrito recientemente que la proteína BAG3 se expresa en 346/346 pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) y es liberada por las células del tumor pancreático, 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 la expresión de BAG3 están relacionados con la supervivencia del paciente. Los resultados del estudio demuestran que el uso de moléculas de ARNip específicas para el ARNm de BAG3 pueden silenciar la expresión del gen bag3 e inducir muerte celular, lo que confirma que la proteína BAG3 es un importante factor de supervivencia para células de tumores pancreáticos y que el descenso de la misma, cuando se combina con gemcitabina, puede contribuir a la erradicación de las células tumorales (Rosati A. et al., 2012).

50 Además, en un artículo reciente hemos descrito que BAG3 liberada de ACDP se une a macrófagos induciendo su activación y la secreción de factores de apoyo de ACDP. También hemos identificado IFITM-2 como un receptor de BAG3 y mostrado que señala través de PI3K y las rutas de p38 y MAPK. Por último, hemos mostrado que el uso de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BAG3 produce crecimiento tumoral reducido y previene la formación de metástasis en tres modelos de ratón diferentes. Por tanto, hemos identificado un bucle paracrino implicado en el crecimiento de ACDP y la expansión metastásica, y mostrado que un anticuerpo anti-BAG3 tiene potencial terapéutico (Rosati A. et al., Nat. Commun. 2015).

El documento WO03/055908 divulga la secuencia de BAG3, la producción de ARN antisentido y anticuerpos que se unen a BAG3 (Acm anti-BAG3 identificado con el número de registro PD02009) para la detección y tratamiento de cáncer.

5 Los tratamientos convencionales de quimioterapia para patologías tumorales, así como los tratamientos de enfermedades inflamatorias e inmunitarias con corticoesteroides o AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos) plantean numerosos inconvenientes unidos a efectos secundarios y no hay, actualmente, medios definitivos de tratar tales patologías.

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

15 **Definiciones**

A menos que se defina de otra manera, todos los términos de la técnica, anotaciones y otra terminología científica usados en el presente documento se pretende que tengan los significados comúnmente entendidos por los expertos en la materia a la que pertenece esta divulgación. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento por claridad y/o para facilidad de referencia; por tanto, la inclusión de tales definiciones en el presente documento no se debe interpretar que representa una diferencia sustancial sobre lo que se entiende en general en la técnica.

20 El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye "fragmentos" o "derivados", que tienen al menos un sitio de unión al antígeno del anticuerpo y/o muestran la misma actividad biológica.

Un anticuerpo preferiblemente comprende al menos una cadena pesada de inmunoglobulina y al menos una cadena ligera de inmunoglobulina. Una cadena de inmunoglobulina comprende un dominio variable y opcionalmente un dominio constante. Un dominio variable puede comprender regiones determinantes de complementariedad (CDR), por ejemplo, una región CDR1, CDR2 y/o CDR3, y regiones marco.

30 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.

35 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.

40 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.

45 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.

El término "hibridoma" se refiere a una célula que produce anticuerpos monoclonales.

50 El término "anticuerpos monoespecíficos" se refiere a anticuerpos que tienen todos afinidad por el mismo antígeno.

El término "anticuerpos multiespecíficos" se refiere a anticuerpos que tienen afinidad por varios antígenos.

55 El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tienen afinidad por dos antígenos diferentes.

Descripción de las figuras

60 Figura 1. ELISA que muestra el cribado para actividad de unión a anticuerpos con un recubrimiento que usa el péptido 2 (fragmento de BAG3).

Figura 2. ELISA que muestra el cribado para actividad de unión a anticuerpos con un recubrimiento que usa proteína BAG3 de longitud completa recombinante.

65 Figura 3. Evaluación por citometría de flujo de la capacidad de las variantes de anticuerpo para bloquear la unión de BAG3 a la superficie de macrófagos.

Figura 4. Efecto de las variantes humanizadas del anticuerpo AC-2 sobre el crecimiento tumoral *in vivo*.

Figura 5. Efecto de la variante humanizada H2L4 del anticuerpo AC-2 sobre fibroblastos activados en la masa tumoral.

5 Figura 6. Cuantificación del efecto de AC-2 H2L4 sobre el número de fibroblastos activados.

Divulgación de la invención

10 Los inventores han encontrado sorprendentemente que inhibidores específicos de BAG3 son capaces de inducir regresión de tumores. En particular, los anticuerpos humanizados anti-BAG3 ensayados mostraron una afinidad particular para la proteína BAG3 y se pueden usar en terapia como inhibidores de BAG3, ya que bloquean la interacción entre la proteína BAG3 y su receptor en las superficies de macrófagos.

15 Además, los datos experimentales descritos en la solicitud demuestran que dichos anticuerpos anti-BAG3 son particularmente eficaces en reducir la activación de fibroblastos y por tanto que se pueden usar en el tratamiento de todas las patologías en donde los fibroblastos se activan mucho, tal como enfermedades neoplásicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunitarias y/o enfermedades degenerativas.

20 Por tanto, una primera forma de realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado o fragmento del mismo que se une a la proteína BAG3 y que comprende:

25 a) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada codificada por SEQ ID NO: 12 o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % a la misma, y

b) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera codificada por SEQ ID NO: 20 o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % a la misma,

30 caracterizado en que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % a la misma comprende las regiones CDR que tienen la siguiente composición de aminoácidos: H-CDR1 comprende los aminoácidos GFNIKDTYMY (SEQ ID N. 3), H-CDR2 comprende los aminoácidos GVPANGNTRYDPKFG (SEQ ID N. 4), H-CDR3 comprende los aminoácidos DGAMDY (SEQ ID N. 5) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % a la misma, comprende las regiones CDR que tienen la siguiente composición de aminoácidos: L-CDR1 comprende los aminoácidos KSSQSLLYSSNQKNYLA (SEQ ID N. 6), L-CDR2 comprende los aminoácidos WASTRES (SEQ ID N. 7) y L-CDR3 comprende los aminoácidos QQYYTYPLT (SEQ ID N. 8).

40 Como se usa en el presente documento, "*identidad de secuencia*" entre dos secuencias de polipéptidos, indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias, preferiblemente a lo largo de la longitud entera de las secuencias de aminoácidos codificadas por SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 20. Las secuencias de polipéptido preferidas de la invención tienen una identidad de secuencia de al menos el 90 %, 97 %, 98 % o 99 %.

45 En una forma de realización preferida de la presente invención dicha secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % con respecto a SEQ ID N. 12 se selecciona de SEQ ID N. 14, SEQ ID N: 16 o SEQ ID N. 18.

50 En una forma de realización preferida adicional dicha secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % con respecto a SEQ ID N. 20 se selecciona de SEQ ID N. 22, SEQ ID N: 24 o SEQ ID N. 26.

En una forma de realización preferida el anticuerpo de la presente invención es el anticuerpo humanizado en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada está codificada por SEQ ID NO. 18 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera está codificada por SEQ ID NO 22 o SEQ ID N. 26.

55 También se divulga un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a la proteína BAG3 y que comprende:

a) una secuencia de nucleótidos de la cadena pesada codificada por SEQ ID NO: 11 o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % a la misma, y

60 b) una secuencia de nucleótidos de la cadena ligera codificada por SEQ ID NO: 19 o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % a la misma.

65 Como se usa en el presente documento, "*identidad de secuencia*" entre dos secuencias de nucleótidos, indica el porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre las secuencias, preferiblemente a lo largo de la longitud entera de las secuencias de nucleótidos codificadas por SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 19. Las secuencias de nucleótidos

preferidas divulgadas tienen una identidad de secuencia de al menos el 85 %, más preferiblemente el 90 %, incluso más preferiblemente el 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

5 En una divulgación adicional dicha secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con respecto a SEQ ID N. 11 se selecciona de SEQ ID N. 13, SEQ ID N: 15 o SEQ ID N. 17.

En una divulgación adicional dicha secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con respecto a SEQ ID N. 19 se selecciona de SEQ ID N. 21, SEQ ID N: 23 o SEQ ID N: 25.

10 En una divulgación adicional el anticuerpo es el anticuerpo en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada está codificada por SEQ ID NO. 17 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera está codificada por SEQ ID NO 21 o SEQ ID N. 25.

15 El anticuerpo humanizado o fragmentos del mismo según la presente invención puede ser cualquier anticuerpo de origen natural y/o sintético, por ejemplo, un anticuerpo de origen mamífero. Preferiblemente, el dominio constante, si está presente, es un dominio constante humano. El dominio variable es preferiblemente un dominio variable de mamífero, por ejemplo, un dominio variable humanizado o humano.

20 Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos monoclonales son preferidos. En particular, los anticuerpos de la presente invención preferiblemente se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpo recombinantes, anticuerpos humanizados o totalmente humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos multiespecíficos, en particular, anticuerpos biespecíficos o fragmentos de los mismos.

25 Los anticuerpos monoclonales se pueden producir por cualquier método adecuado tal como el de Köhler y Milstein (1975) o por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de genotecas de anticuerpos de fagos usando técnicas descritas en Clackson et al. (1991).

30 Las formas humanizadas de los anticuerpos se pueden generar según los métodos conocidos en la técnica (Kettleborough C. A. et al., 1991), tal como quimerización o injerto de CDR. Los métodos alternativos para la producción de anticuerpos humanizados se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en los documentos EP 0239400 y WO 90/07861. Los anticuerpos humanos también se pueden derivar por métodos in vitro. Los ejemplos adecuados incluyen, pero no están limitados a, presentación en fagos, presentación en levaduras, y similares.

35 Según la presente invención "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden polipéptidos de diferentes especies, tal como, por ejemplo, ratón y humano. La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en el documento WO 89/09622.

40 El término anticuerpo incluye "fragmentos" o "derivados", que tienen al menos un sitio de unión al antígeno del anticuerpo.

Según una forma de realización preferida el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo puede ser un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab'), un fragmento Fv, un diacuerpo, un scFv, un inmunofármaco modular pequeño (SMIP), un aficuerpo, un avímero, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio y/o cadenas individuales.

45 El anticuerpo humanizado de la invención puede ser preferiblemente del tipo de anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE. Se apreciará que los anticuerpos que se generan no necesitan poseer inicialmente tal isotipo sino, más bien que el anticuerpo como se genera puede poseer cualquier isotipo y que el anticuerpo puede cambiar de isotipo.

50 Una forma de realización adicional de la invención es un vector que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo humanizado de la invención. Dicho vector se selecciona de un fago, un plásmido, un vector vírico o retrovírico. Preferiblemente, el vector de la invención es un vector de expresión en donde la molécula de ácido nucleico está operativamente unida a una o más secuencias de control que permitan la transcripción y opcionalmente la expresión en células huéspedes procariontas y/o eucariotas.

55 Una forma de realización adicional de la presente invención es un huésped que comprende el vector de la invención, seleccionado de una célula procariota o eucariota, preferiblemente una célula de mamífero o humana, o un animal transgénico no humano.

60 También se divulga un método para la preparación del anticuerpo o un fragmento del mismo divulgado anteriormente, que comprende cultivar el huésped de la invención en condiciones que permitan la síntesis de dicho anticuerpo y recuperar dicho anticuerpo de dicho cultivo.

65 Se divulga un anticuerpo o fragmento del mismo obtenido por los métodos divulgados anteriormente.

Una forma de realización adicional de la presente invención es el uso del anticuerpo humanizado anteriormente mencionado o un fragmento del mismo como medicamento, preferiblemente en el tratamiento de un estado patológico particular que implica la activación de macrófagos. Tal estado patológico se puede elegir de: enfermedades neoplásicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunitarias o enfermedades degenerativas.

5 Preferiblemente, tales enfermedades neoplásicas pueden ser tumor pancreático o tumor de vejiga, más preferiblemente tumor pancreático.

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

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 hematológicas, enfermedades de la piel o vasculitis, y más preferiblemente, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, conectivitis, lupus eritematoso, endometriosis o colitis ulcerosa.

20 Preferiblemente, dichas enfermedades degenerativas se pueden elegir de enfermedades neurodegenerativas y enfermedades degenerativas musculares, y más preferiblemente enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, o distrofia muscular.

25 Un fin adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado anteriormente mencionado o fragmento del mismo en asociación con al menos un excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

Una divulgación adicional es el uso de dicha composición como un medicamento.

30 Una divulgación adicional es el uso de la composición en el tratamiento de enfermedades neoplásicas y enfermedades de una naturaleza inflamatoria, inmunitaria y/o degenerativa, preferiblemente enfermedad neoplásica, seleccionada de tumor pancreático o tumor de vejiga.

35 La composición de 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.

En una divulgación preferida dicha forma oral se puede elegir de las siguientes: comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones, gránulos y cápsulas oleaginosas.

40 En una divulgación preferida adicional dicha forma tópica se puede elegir de los siguiente: crema, pomada, pomada, solución, suspensión, gotas oculares, óvulo vaginal, solución nebulizadora, espray, polvo o gel.

En una divulgación preferida adicional dicha forma parenteral puede ser o bien una solución tampón acuosa o una suspensión oleaginosa.

45 Dicha administración parenteral incluye administración por medio intramuscular, intravenoso, intradérmico, subcutáneo, intraperitoneal, intranodal o intraesplénico.

50 Preferiblemente la composición farmacéutica según la presente invención comprende un principio activo adicional, seleccionado de antimetabolitos, camptotecinas o taxanos.

Más preferiblemente dichos principios activos se seleccionan de: gemcitabina, 5-fluorouracilo, irinotecano, oxaliplatino, paclitaxel unido a albúmina, capacitabina, cisplatino, paclitaxel, docetaxel o liposoma de irinotecano.

55 Ejemplos

Ejemplo 1 – Quimerización y humanización del anticuerpo AC2.

60 El anticuerpo murino AC-2 se produce por un hibridoma aislado del clon madre de hibridoma no. PD02009 depositado el 17/12/2002 en el Centro de Biotecnología Avanzada de Génova y divulgado en el documento WO03/055908. El ARN total se extrajo y se realizó RT-PCR para clonar y secuenciar las regiones variables del anticuerpo usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos).

65 Basado en información de secuencia de la región variable, la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo murino AC-2 (SEQ ID No. 1 y SEQ ID N. 2 para las secuencias de aminoácidos y SEQ ID 9 y SEQ ID N. 10 para las secuencias

de nucleótidos), se han obtenido diferentes variantes humanizadas de dicha región por síntesis génica usando procedimientos estándar.

5 Las secuencias que codifican las variantes del anticuerpo se clonaron en el vector de expresión Evi-5 (Evitria AG, Suiza) y se expresaron en células CHO-K1.

Para la quimerización del anticuerpo, las regiones constantes murinas se sustituyeron con las regiones constantes humanas. Se hizo una versión quimérica de la cadena pesada (HC) en un contexto de IgG1.

10 Para la humanización del anticuerpo, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo murino se injertaron en un marco del humano.

Se hicieron veinticuatro versiones humanizadas de la cadena pesada (HC) en un contexto de IgG1 y LC-kappa. Cada versión se caracteriza por mutaciones puntuales específicas en la FR.

15 **Ejemplo 2 – Cribado para actividad de unión de anticuerpo**

Se ensayaron Ac quiméricos y variantes humanizadas en paralelo para la capacidad de unirse a BAG3, usando un ensayo ELISA indirecto.

20 *Materiales y Métodos*

Se recubrieron microplacas de 96 pocillos (NUNC Maxisorp) usando una secuencia específica (Pep2) en la proteína BAG3 de longitud completa (desde el aa 385 al aa 399) reconocida por el anticuerpo murino (AC-2). La placa se incubó durante la noche con 1 µg/ml de Pep2 (50 µl/pocillo) en un tampón fosfato (PBS, pH 7,4). A continuación, la placa se lavó dos veces con una solución detergente (Tween-20 al 0,05 % en PBS), y el bloqueo de los sitios no específicos se realizó durante una hora a temperatura ambiente usando, para cada pocillo, 150 µl de una solución de gelatina de pescado al 0,5 % (Sigma) en tampón fosfato (PBS, pH 7,4). Las placas se lavaron dos veces con el tampón de lavado y después los anticuerpos se cargaron. En algunos de los pocillos, se cargaron diluciones a escala de variantes quiméricas y humanizadas del anticuerpo, 500 ng/ml (50 µl/pocillo) en duplicado. Los anticuerpos se diluyeron en una solución de gelatina de pescado al 0,5 %, Tween al 0,05 % en PBS (BSA/Tween). La placa se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y después se lavó durante 5 veces con tampón de lavado. Las muestras se incubaron después 30 minutos a temperatura ambiente con 50 µl/pocillo de anti-IgG de ratón conjugado a HRP o anti-IgG humana conjugado a HRP como el anticuerpo secundario. Después de 6 lavados con el tampón de lavado, el sustrato de la peroxidasa, tetrametilbenzidina (TMB) se añadió a los pocillos (50 µl/pocillo). La reacción colorimétrica se bloqueó después de 10 minutos por la adición de ácido sulfúrico 0,5 M (25 µl/pocillo) y los valores de densidad óptica (DO) se detectaron usando un espectrofotómetro a la longitud de onda de 450 nm (Figura 1). Las variantes quiméricas y humanizadas del anticuerpo también se ensayaron usando placas recubiertas con proteína de longitud completa BAG3 recombinante (rBAG3) por ensayo ELISA indirecto usando el mismo protocolo descrito anteriormente (Figura 2).

40 *Resultados*

La unión de las diferentes variantes de anticuerpo se detectó en ELISA usando el péptido 2 como recubrimiento (Fig. 1) o BAG3 de longitud completa recombinante (Fig. 2). Las siguientes variantes de anticuerpo mostraron mayor capacidad de unión y se eligieron para análisis adicional: H1L2, H1L3, H1L4, H2L2, H2L3, H2L4, H3L2, H3L3, H3L4, H4L2, H4L3, H4L4.

Ejemplo 3 – Determinación de la KD de variantes de anticuerpo humanizadas

50 *Materiales y Métodos*

Se realizaron experimentos de unión en Octet Red96 a 25 °C. Los anticuerpos se capturaron en sensores de inmersión y lectura AHC (captura anti-Fc de IgG humana), seguido por unión de Ag (rBAG3 de E. coli) a concentraciones variables. La unión del antígeno a los anticuerpos se siguió en tiempo real para obtener las constantes de asociación (ka) y disociación (kd). La constante de equilibrio (KD) se calculó a partir de las ka y kd observadas.

Se realizó el análisis cinético completo usando concentraciones de analito desde 100 nM a 0. El análisis se realizó usando concentraciones de analito de 100 nM y carrera con diluciones en serie en tampón de ensayo, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 y 0 nM. Se llevó a cabo análisis de Chi cuadrado (χ^2) entre el sensorgrama real (línea coloreada) y el sensorgrama generado del software de análisis Fortebio Octet (línea roja) para determinar la precisión del análisis. Un valor en 1-2 se considera significativo (preciso) y por debajo de 1 es muy significativo (muy preciso).

Nota: se usaron 2x 8 sensores para 1 análisis cinético completo, los sensores se regeneraron y usaron múltiples veces y capturaron con BAG-H-L, BAG-H1-L2, BAG-H1-L3, BAG-H1-L4, BAG-H2-L2, BAG-H2-L3, BAG-H2-L4, BAG-H3-L2, BAG-H3-L3, BAG-H3-L4, BAG-H4-L2, BAG-H4-L3, BAG H4-L4 para realizar 13 cinéticas completas.

Resultados

La afinidad para las diferentes variantes calculado como antes se describe a continuación. El anticuerpo murino AC-2 mostró una KD (M) de 10^{-12} mientras que todas las variantes humanas mostraron una KD (M) de 10^{-9} (véase la tabla 1). Sin embargo, esta diferencia no tuvo impacto en la actividad biológica de las variantes como se describirá.

Tabla 1. Afinidad de las variantes del anticuerpo AC-2

Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD (M)	e conc. En nM	Chi ²
BAG-H-L	rBAG3	2.15×10^5	5.71×10^{-4}	2.66×10^{-9}	0-50	0.145
BAG-H1-L2	rBAG3	2.23×10^5	6.35×10^{-4}	2.84×10^{-9}	0-50	0.174
BAG-H1-L3	rBAG3	2.17×10^5	6.15×10^{-4}	2.83×10^{-9}	0-50	0.168
BAG-H1-L4	rBAG3	2.42×10^5	5.66×10^{-4}	2.34×10^{-9}	0-50	0.186
BAG-H2-L2	rBAG3	2.46×10^5	6.47×10^{-4}	2.63×10^{-9}	0-50	0.514
BAG-H2-L3	rBAG3	2.25×10^5	4.47×10^{-4}	1.98×10^{-9}	0-50	0.283
BAG-H2-L4	rBAG3	2.33×10^5	4.75×10^{-4}	2.04×10^{-9}	0-50	0.298
BAG-H3-L2	rBAG3	1.93×10^5	3.45×10^{-4}	1.78×10^{-9}	0-50	0.128
BAG-H3-L3	rBAG3	2.05×10^5	3.35×10^{-4}	1.61×10^{-9}	0-50	0.128
BAG-H3-L4	rBAG3	2.29×10^5	3.91×10^{-4}	1.70×10^{-9}	0-50	0.270
BAG-H4-L2	rBAG3	1.92×10^5	3.90×10^{-4}	2.02×10^{-9}	0-50	0.185
BAG-H4-L3	rBAG3	2.02×10^5	4.03×10^{-4}	1.98×10^{-9}	0-50	0.193
BAG-H4-L4	rBAG3	2.33×10^5	4.01×10^{-4}	1.72×10^{-9}	0-50	0.240

Ejemplo 4 – Evaluación de la capacidad de las variantes del anticuerpo para bloquear la unión de BAG3 a superficie de macrófagos

BAG3 se une a la superficie de macrófagos y se ha mostrado que la unión se inhibe específicamente por el anticuerpo murino anti-BAG3 AC-2 que secuestra la proteína BAG3. Aquí se ensayó la capacidad de las variantes químicas y humanizadas del anticuerpo de bloquear la unión a la superficie de macrófagos.

Materiales y Métodos

Se incubaron células J774 A.1 (1×10^6 /ml) con solución de bloqueo (PBS que contenía SBF al 5 %/NaN₃ al 0,1 %) y con FcR bloqueante de ratón (Miltenyi Biotec-cod. 130-092-575) (1μ l/ 1×10^6 células) durante 30 min a 4 °C. A continuación, se incubaron 1×10^5 células con proteína FITC-rBAG3 (40 μ g/ml) sola o en presencia de anticuerpo de ratón anti-BAG3 (AC2) (3200 μ g/ml) o IgG1 murina (3200 μ g/ml) en solución de bloqueo, durante 30 minutos en hielo. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se analizaron por citometría de flujo.

Resultados

Evaluación por citometría de flujo de unión de BAG3 fluorescente a la superficie de la línea celular de macrófagos J774 A.1. Los datos se describen como intensidad de fluorescencia media (Figura 3). En base a estos resultados, se eligieron las variantes del anticuerpo humanizadas H4L2, H4L3, H4L4 y H2L4.

Ejemplo 5 – Evaluación de la capacidad de variantes humanizadas del anticuerpo AC-2 para bloquear la activación de monocitos primarios

Se seleccionaron las variantes humanizadas del anticuerpo H4L2, H4L3, H4L4 y H2L4, se purificaron por medio de captura con proteína A (HiTrap Protein A HP, GE Healthcare), y se ensayó además su capacidad de bloquear la activación de monocitos humanos primarios.

5 Hemos mostrado previamente que BAG3 puede activar macrófagos humanos primarios. Aquí se usa la secreción de IL-6 como una lectura de la activación de macrófagos para mostrar la capacidad de las variantes de anticuerpo humanizadas H4L2, H4L3 y H4L4 para bloquear la activación de monocitos dependiente de BAG3.

Materiales y Métodos

10 Se obtuvieron capas leucocíticas (CompoFlex® Triple "Top and Top" System -Fresenius Kabi) de donantes sanos y se almacenaron durante la noche a 4 °C. Se aislaron las CMSP en gradientes de densidad Ficoll-Hypaque estándar. Las células mononucleares se aislaron y sometieron a lavados secuenciales con 50 ml de PBS 1X con el fin de eliminar contaminaciones de plaquetas y eritrocitos; (I: a 1100 g durante 20 min; II: a 800 g durante 10 min; III: a 400 g durante 15 10 min; IV: a 300 g durante 10 min; V y VI: a 100 g durante 10 min). Todas las centrifugaciones se hicieron con el freno desconectado. Las células se comprobaron después en el microscopio y si todavía había contaminaciones presentes, se realizó una centrifugación adicional a 100 g durante 10 min.

20 Las CMSP se sembraron después en microplacas de 96 pocillos (2×10^6 células/ml) y se cultivaron en RPMI sin glutamina (100 μ l/pocillo) sin SBF y con reactivo de bloqueo FcR humano (1 μ l cada millón de células) (Miltenyi 130-059-901) durante 16 horas (durante la noche).

25 El día después, las células se trataron durante 6 h con rBAG3 (0,5 μ g/ml). Se realizaron ensayos de bloqueo de Acm incubando la rBAG3 junto con diferentes concentraciones de AC-2 o las variantes humanizadas.

30 El tratamiento se realizó sin cambiar el medio a las células, pero añadiendo 100 μ l de RPMI sin SBF a cada pocillo que contenía moléculas descritas anteriormente. Todas las moléculas se añadieron a 100 μ l de RPMI sin SBF en un tubo estéril y las moléculas se añadieron al doble de su concentración final a las células. Las moléculas se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en los tubos y después se añadieron a las células. La preincubación es necesaria para los ensayos de bloqueo de Acm. Después del tratamiento, el medio de cultivo de las células se recogió después de centrifugación a 400 g durante 5 minutos. Los sobrenadantes se analizaron para el contenido de IL-6 en duplicado a una dilución 1:10 con un kit de IL-6 ELISA humano (eBioscience, San Diego, CA). La concentración de IL-6 se evaluó por comparación de la DO de la muestra con la de una curva patrón de IL-6 recombinante.

Resultados

40 Los resultados descritos en la tabla 2 se expresan como el % de inhibición de la producción de IL-6 inducida por rBAG3 por los diferentes anticuerpos. Todas las variantes muestran capacidad inhibidora comparable al anticuerpo anti-BAG3 AC2 murino. H4L2 y H4L4 se eligieron para ensayo adicional in vivo, para su capacidad para bloquear el crecimiento tumoral en un modelo tumoral de xenoinjerto.

Tabla 2

% de inhibición de secreción de IL6 dependiente de BAG3		
AC2 120x	AC2 60x	AC2 30x
85.9%	53.4%	13.1%
74.4%	31.8%	18.6%
H4L2 120x	H4L260x	H4L2 30x
80.3%	47.4%	14.2%
71.0%	27.4%	2.0%
H4L3 120x	H4L3 60x	H4L3 30x
80.4%	51.2%	25.9%
73.2%	42.3%	20.4%
H4L4 120x	H4L4 60x	H4L4 30x
84.3%	46.4%	3.15%
75.0%	41.2%	7.7%
H2L4 120x	H2L4 60x	H2L4 30x
83.0%	52.0%	2.14%
73.7%	53.2%	25.9%
B12 120x	B12 60x	B12 30x
1.3%	0.7%	3.2%
0.1%	3.1%	0.7%

Ejemplo 6 – Efecto de variantes humanizadas del anticuerpo AC2 sobre el crecimiento tumoral in vivo

5 Basado en experimentos in vitro se eligen las variantes H4L2 y H2L4 para la posterior validación in vivo.

Materiales y métodos

10 Se suspendieron células Mia-Paca 2 (2×10^6) en PBS (200 μ l) y se inyectaron en el flanco derecho de ratones CD1 hembras (6 semanas de edad; Charles River, Italia). Después de 10 días los ratones se dividieron en cuatro brazos consistentes en 7 (control) o 6 (tratados) ratones cada uno en los que el volumen tumoral medio variaba de 80-100 mm³. El grupo control recibió inyección i.p. de vehículo (PBS) cada 48 horas mientras que los grupos tratados recibieron inyección i.p. cada 48 horas de Acm anti-BAG3 murino (AC2) o humanizado H2L4, H4L2 a las dosis de 20 mg/kg en PBS durante 5 semanas. Los animales se pesaron y el volumen tumoral se midió por calibrador ($D \times d^2/2$) una vez a la semana.

Resultados

20 La figura 4 describe el cambio tumoral en veces a intervalos semanales de control (PBS) o animales tratados con los anticuerpos indicados. La proporción es entre el volumen medio en el punto de tiempo indicado y el volumen medio el día 0. Mientras que los animales tratados control muestran un aumento de 4 veces, los animales tratados solo aumentan en 2,5 veces.

25 **Ejemplo 7 – Impacto de la variante H2L4 de AC-2 humanizada sobre el número de fibroblastos activados en la masa tumoral**

Los resultados obtenidos sobre el crecimiento tumoral nos impulsaron a investigar adicionalmente cambios en el microentorno tumoral. Uno de los jugadores principales en el desarrollo del tumor son los fibroblastos asociados a la masa del tumor.

5 Materiales y métodos

Al final del experimento descrito en ejemplo 6, los tumores se embebieron en parafina y se analizaron secciones por inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti- α sma (A2547, Sigma-Aldrich, a 1:350). Los núcleos se contratiñeron con Hoechst 33342 (Molecular Probes, Oregón, EE UU) 1 μ g ml⁻¹. Las imágenes se adquirieron en modo barrido secuencial usando los mismos parámetros de adquisición (intensidades de láser, fotomultiplicadores de ganancia, apertura de agujero, objetivo x40, zoom 1) cuando se compara material experimental y control. Se usaron Leica Confocal Software e ImageJ para el análisis de los datos (% de área positiva para α -sma).

15 Resultados

La figura 5 muestra imágenes representativas de 2 tumores tratados con PBS y 2 tratados con AC-2 H2L4 de tinción de α -sma. La presencia de fibroblastos activados asociados con las masas crecidas en los animales control es muy alta como se demuestra por positividad de la proteína α -sma. En su lugar, los animales tratados con AC-2 H2L4 son negativos. En la figura 6 hemos descrito una cuantificación de área positiva de α -sma comparando muestras control (tratadas con PBS) y tratadas con AC-2 H2L4.

Estos datos apoyan fuertemente la evidencia de que anticuerpos humanizados anti-BAG3 tienen un efecto sobre los fibroblastos que tienen un papel importante no solo en enfermedades neoplásicas, sino también en otros procesos patológicos tal como inflamación (Kalluri, 2016).

25 **Referencias**

- Ammirante M, Rosati A, Arra C, Basile A, Falco A, Festa M, Pascale M, d'Avenia M, Marzullo L, Belisario MA, De Marco M, Barbieri A, Giudice A, Chiappetta G, Vuttariello E, Monaco M, Bonelli P, Salvatore G, Di Benedetto M, Deshmane SL, Khalili K, Turco MC, Leone A. "IKK γ protein is a target of BAG3 regulatory activity in human tumor growth". Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(16):7497-502.
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 1991; 15:352(6336):624-8.
- Festa M, Del Valle L, Khalili K, Franco R, Scognamiglio G, Graziano V, De Laurenzi V, Turco MC, Rosati A. "BAG3 protein is overexpressed in human glioblastoma and is a potential target for therapy". Am J Pathol. 2011;178(6):2504-12.
- Franceschelli S, Rosati A, Leroise R, De Nicola S, Turco MC, Pascale M. "Bag3 gene expression is regulated by heat shock factor 1". J Cell Physiol. 2008; 215(3):575-7.
- Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. Nature Reviews Cancer. 2016; 16,582-598
- Kettleborough CA, Saldanha J, Heath VJ, Morrison CJ, Bendig MM. "Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation". Protein Eng. 1991; 4(7):773-83.
- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495-497.
- Rosati A, Graziano V, De Laurenzi V, Pascale M, Turco MC. "BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways". Cell Death Dis. 7 Abr 2011;2:e141.
- Rosati A, Bersani S, Tavano F, Dalla Pozza E, De Marco M, Palmieri M, De Laurenzi V, Franco R, Scognamiglio G, Palaia R, Fontana A, di Sebastiano P, Donadelli M, Dando I, Medema JP, Dijk F, Welling L, di Mola FF, Pezzilli R, Turco MC, Scarpa A. "Expression of the antiapoptotic protein BAG3 is a feature of pancreatic adenocarcinoma and its overexpression is associated with poorer survival". Am J Pathol. Nov 2012;181 (5):1524 -9.
- Rosati A, Basile A, D'Auria R, d'Avenia M, De Marco M, Falco A, Festa M, Guerriero L, Iorio V, Parente R, Pascale M, Marzullo L, Franco R, Arra C, Barbieri A, Rea D, Menichini G, Hahne M, Bijlsma M, Barcaroli D, Sala G, di Mola FF, di Sebastiano P, Todoric J, Antonucci L, Corvest V, Jawhari A, Firpo MA, Tuveson DA, Capunzo M, Karin M, De Laurenzi V, Turco MC. "BAG3 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma growth by activating stromal macrophages". Nat Commun., 6:8695 doi: 10.1038/ncomms9695.

Lista de secuencias

<110> Biouniversa S.r.l.

<120> Anticuerpo humanizado

<160> 26

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> ratón

5

<400> 1
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

10 <210> 2
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> ratón

15 <400> 2
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 Lys

20 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ratón

<400> 3
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met Tyr
 1 5 10

25

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ratón

30

<400> 4
 Gly Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 5

<211> 6
 <212> PRT
 <213> ratón

5 <400> 5
 Asp Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> ratón

<400> 6
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala

15 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ratón

20 <400> 7
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

25 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ratón

30 <400> 8
 Gln Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

35 <210> 9
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> ratón

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1...345
 <223> /tipo de molécula = "ADN genómico"
 /organismo = "ratón"

<400> 9
 gaggtccagc tgcagcagag cgggtgccgaa ctggtgaagc caggagcatc cgtcaaactg 60
 tcttgtacag catccgggtt taacattaag gacacctaca tgtattgggt gaaacagagg 120
 ccagagcagg gcctggaatg gatcggcgga gtggaccccg ctaacgggaa tacacgatac 180
 gatcctaagt tccagggaaa agccaccctg acagctgaca cttccagctc taccgcatat 240
 ctgcaactga gttccctgac atctgaggat actgccgtgt actattgcmg gagggatggg 300
 gctatggact actgggggtca ggggacttcc gtcactgtct cgagc 345

45 <210> 10
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> ratón

50 <220>

ES 2 808 947 T3

<221> fuente
 <222> 1...339
 <223> /tipo de molécula = "ADN genómico"
 /organismo = "ratón"

5

<400> 10
 gatattgtga tgtctcagtc cccaagcagc ctggcagtct cagtcggcga aaaggtgacc 60
 atgtcctgta aatcctctca gtcctctgctg tactccagca accagaagaa ttatctggca 120
 tggcaccagc agaagcccgg acagagtcct aaactgctga tctactgggc cagcacaagg 180
 gagtctggcg tgccagaccg gttcactggc tcaggctccg ggaccgattt taccctgaca 240
 atctctagtg tcaaagccga agacctggct atctactatt gccagcagta ttacacttat 300
 cctctgacat ttggagcagg gactaaactg gaactgaag 339

<210> 11
 <211> 1416
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> fuente
 <222> 1...1416
 <223> /tipo de molécula = "otro ADN"
 /organismo = "Homo sapiens"

15

<400> 11
 gcggccgcca tgaatthtgg actgaggctg atthtctctg tgctgacct gaaaggcgtc 60
 cagtgtcagg tgcagctggt ccagagcggg gcagaggtga agaaaccagg tgccagcgtg 120
 aaggctctctt gcaaagccag tggcttcaac atcaaggaca catacatgta ttgggtgcga 180

20

ES 2 808 947 T3

```

caggcccctg gccagggctct ggaatggatg ggcggcgtgg accccgcaaa tggaaatact      240
agatacgatc ctaaatttca ggaaggggtg accatgacac gggacacttc aacctcgacg      300
gtctatatgg agctgtccag cctgagatcc gaagatacag ccgtgtacta ttgtgcccgc      360
gacggggcta tggattactg gggccagggg actctgggtga ccgtctcgag cgctagcaca      420
aagggcccta gtgtgtttcc tctggctccc tcttccaaat ccacttctgg tggcactgct      480
gctctgggat gcctggtgaa ggattacttt cctgaacctg tgactgtctc atggaactct      540
ggtgctctga cttctgggtg ccacactttc cctgctgtgc tgcagtctag tggactgtac      600
tctctgtcat ctgtggtcac tgtgccctct tcatctctgg gaaccagac ctacatttgt      660
aatgtgaacc acaaaccatc caacactaaa gtggacaaaa aagtggaacc caaatcctgt      720
gacaaaacc acacctgccc accttgcct gccctgaac tgctgggagg accttctgtg      780
tttctgttcc ccccaaac aaaggatacc ctgatgatct ctagaacccc tgaggtgaca      840
tgtgtgggtg tggatgtgtc tcatgaggac cctgagggtca aattcaactg gtacgtggat      900
ggagtggaag tccacaatgc caaaaccaag cctagagagg aacagtacaa ttcaacctac      960
agagtgggtc gtgtgctgac tgtgctgcat caggattggc tgaatggcaa ggaatacaag     1020
tgtaaagtct caaacaaggc cctgcctgct ccaattgaga aaacaatctc aaaggccaag     1080
ggacagccta ggaacccca ggtctacacc ctgccacctt caagagagga aatgaccaa     1140
aaccaggtgt ccctgacatg cctgggtcaaa ggcttctacc cttctgacat tgctgtggag     1200
tgggagtcaa atggacagcc tgagaacaac tacaaaaca cccccctgt gctggattct     1260
gatggctctt tctttctgta ctccaaactg actgtggaca agtctagatg gcagcagggg     1320
aatgtctttt cttgctctgt catgcatgag gctctgcata accactacac tcagaaatcc     1380
ctgtctctgt ctcccgggaa atgatagtaa aagctt                                  1416

```

<210> 12
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

```

<400> 12
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20          25          30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45
Gly Gly Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe
50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

```

Ala Arg Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 13
 <211> 1416
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1...1416
 <223> /tipo de molécula = "otro ADN"
 /organismo = "Homo sapiens"

<400> 13
 gcggccgcca tgaattttgg actgaggctg attttcctgg tgctgaccct gaaaggcgtc 60
 cagtgtcagg tgcagctggt ccagtcctgga gctgaggtga agaaaccagg agcctccgtg 120
 15 aaggtctctt gcaaagccag tggcttcaac atcaaggaca catacatgta ttgggtgcga 180

ES 2 808 947 T3

```

caggcccctg gccaggggtct ggaatggatg ggcggcgtgg accccgcaaa tggaaatact      240
agatacgatc ctaaatttca aggcaggggtg accctgacac gggacacttc aacctcgacg      300
gtctatatgg agctgtccag cctgagatcc gaagatacag cagtgtacta ttgtgggcgc      360
gacgggtgcta tggactactg gggccagga actctgggtga ccgtctcgag cgctagcaca      420
aagggcccta gtgtgtttcc tctggctccc tcttccaaat ccacttctgg tggcactgct      480
gctctgggat gcctggtgaa ggattacttt cctgaacctg tgactgtctc atggaactct      540
ggtgctctga cttctgggtg ccacactttc cctgctgtgc tgcagtctag tggactgtac      600
tctctgtcat ctgtggtcac tgtgccctct tcatctctgg gaaccagac ctacatttgt      660
aatgtgaacc acaaaccatc caaactaaa gtggacaaaa aagtggaacc caaatcctgt      720
gacaaaacc acacctgcc accttgcct gccctgaac tgctgggagg accttctgtg      780
tttctgttcc ccccaaacc aaagatacc ctgatgatct ctagaacccc tgaggtgaca      840
tgtgtgggtg tggatgtgtc tcatgaggac cctgaggtca aattcaactg gtacgtggat      900
ggagtggaag tccacaatgc caaaaccaag cctagagagg aacagtacaa ttcaacctac      960
agagtggcca gtgtgctgac tgtgctgcat caggattggc tgaatggcaa ggaatacaag     1020
tgtaaagtct caaacaaggc cctgctgct ccaattgaga aaacaatctc aaaggccaag     1080
ggacagccta ggaacccca ggtctacacc ctgccacctt caagagagga aatgacccaa     1140
aaccaggtgt ccctgacatg cctgggtcaaa ggcttctacc cttctgacat tgctgtggag     1200
tgggagtcaa atggacagcc tgagaacaac tacaaaacaa cccccctgt gctggattct     1260
gatggctctt tctttctgta ctccaaactg actgtggaca agtctagatg gcagcagggg     1320
aatgtctttt cttgctctgt catgcatgag gctctgcata accactacac tcagaaatcc     1380
ctgtctctgt ctcccgggaa atgatagtaa aagctt                                  1416

```

<210> 14
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

```

<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20          25          30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45
Gly Gly Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe
50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Gly Arg Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

```


ES 2 808 947 T3

agatacgatc ctaagtttca aggcaaagcc accctgacaa gggacacttc aacctcgacg 300
 gtgtatatgg agctgtccag cctgaggtcc gaagatacag cagtgtacta ttgtgggchg 360
 gacgggtgcta tggactactg gggccagggga actctggtga ccgtctcgag cgctagcaca 420
 aagggcccta gtgtgtttcc tctggctccc tcttccaaat ccacttctgg tggcactgct 480
 gctctgggat gcctggtgaa ggattacttt cctgaacctg tgactgtctc atggaactct 540
 ggtgctctga cttctggtgt ccacactttc cctgctgtgc tgcagtctag tggactgtac 600
 tctctgtcat ctgtggtcac tgtgccctct tcatctctgg gaaccagac ctacatttgt 660
 aatgtgaacc acaaaccatc caacactaaa gtggacaaaa aagtggaacc caaatcctgt 720
 gacaaaacc acacctgcc accttgtcct gccctgaac tgctgggagg accttctgtg 780
 tttctgttcc cccccaacc aaaggatacc ctgatgatct ctagaacccc tgaggtgaca 840
 tgtgtggtgg tggatgtgtc tcatgaggac cctgaggtca aattcaactg gtactggat 900
 ggagtggaag tccacaatgc caaaaccaag cctagagagg aacagtacaa ttcaacctac 960
 agagtggtca gtgtgctgac tgtgctgcat caggattggc tgaatggcaa ggaatacaag 1020
 tgtaaagtct caaacaaggc cctgcctgct ccaattgaga aaacaatctc aaaggccaag 1080
 ggacagccta ggggaaccca ggtctacacc ctgccacct caagagagga aatgaccaa 1140
 aaccaggtgt ccctgacatg cctggtcaaa ggcttctacc cttctgacat tgctgtggag 1200
 tgggagtcaa atggacagcc tgagaacaac taaaaacaa cccccctgt gctggattct 1260
 gatggctctt tttttctgta ctccaaactg actgtggaca agtctagatg gcagcagggg 1320
 aatgtctttt cttgctctgt catgcatgag gctctgcata accactacac tcagaaatcc 1380
 ctgtctctgt ctcccgggaa atgatagtaa aagctt 1416

<210> 16
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 16
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 17
 <211> 1416
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1...1416
 <223> /tipo de molécula = "otro ADN"
 /organismo = "Homo sapiens"

<400> 17
 gcggccgcca tgaattttgg actgaggctg attttctctgg tgctgaccct gaaagcgtc 60
 cagtgtgagg tgcagctggt ccagagtggg gcagaagtga agaaaccagg tgccacagtg 120
 aagatctcat gcaaagtctc cggcttcaac attaaggaca cttacatgta ttgggtgacg 180
 caggcccccg gcaaggtctt ggagtggatg ggcggcgtgg accccgctaa cggcaatacc 240

15

ES 2 808 947 T3

```

agatacgatc ctaagtttca aggacgggtg accatcacag ctgacactag caccgatacg      300
gcatatatgg agctgtccag cctgagatct gaagatacag cagtgtacta ttgtgccagg      360
gacggggcta tggattactg gggccagggg actctgggtg cagtctcgag cgctagcaca      420
aagggcccta gtgtgtttcc tctggctccc tcttccaaat ccacttctgg tggcactgct      480
gctctgggat gcctggtgaa ggattacttt cctgaacctg tgactgtctc atggaactct      540
ggtgctctga cttctgggtg ccacactttc cctgctgtgc tgcagtctag tggactgtac      600
tctctgtcat ctgtggtcac tgtgccctct tcatctctgg gaaccagac ctacatttgt      660
aatgtgaacc acaaaccatc caacactaaa gtggacaaaa aagtggaacc caaatcctgt      720
gacaaaacc acacctgcc accttgtcct gccctgaac tgctgggagg accttctgtg      780
tttctgttcc ccccaaac aaaggatacc ctgatgatct ctagaacccc tgaggtgaca      840
tgtgtgggtg tggatgtgtc tcatgaggac cctgaggtca aattcaactg gtacgtggat      900
ggagtggaag tccacaatgc caaaaccaag cctagagagg aacagtacaa ttcaacctac      960
agagtgggtc gtgtgctgac tgtgctgcat caggattggc tgaatggcaa ggaatacaag    1020
tgtaaagtct caacaaggc cctgcctgct ccaattgaga aaacaatctc aaaggccaag    1080
ggacagccta gggaacccca ggtctacacc ctgccacctt caagagagga aatgaccaa    1140
aaccaggtgt ccctgacatg cctgggtcaaa ggcttctacc cttctgacat tgctgtggag    1200
tgggagtcaa atggacagcc tgagaacaac tacaaaacaa cccccctgt gctggattct    1260
gatggctctt tctttctgta ctccaaactg actgtggaca agtctagatg gcagcagggg    1320
aatgtctttt cttgctctgt catgcatgag gctctgcata accactacac tcagaaatcc    1380
ctgtctctgt ctcccgggaa atgatagtaa aagctt                                1416

```

<210> 18
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

```

<400> 18
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20        25        30
Tyr Met Tyr Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35        40        45
Gly Gly Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe
50        55        60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65        70        75        80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85        90        95
Ala Arg Asp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100       105       110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

```

ES 2 808 947 T3

```

          115                120                125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
   130                135                140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                150                155                160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
          165                170                175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
          180                185                190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195                200                205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210                215                220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                230                235                240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
          245                250                255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
          260                265                270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275                280                285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290                295                300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                310                315                320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
          325                330                335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
          340                345                350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
          355                360                365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
          370                375                380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385                390                395                400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
          405                410                415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
          420                425                430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435                440                445

```

<210> 19
 <211> 741
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1...741
 <223> /tipo de molécula = "otro ADN"
 /organismo = "Homo sapiens"

```

<400> 19
gcgggccgcca tgaattttgg actgaggctg attttcctgg tgctgaccct gaaaggcgctc      60
cagtgatgaca tcgtgatgac acagtcacct gattccctgg cagtcagtct gggcgagaga      120
gccactatta actgcaagtc cagccagtct ctgctgtact ctagtaacca gaaaaattac      180
ctggcttggt atcagcagaa gccagggcag ccccctaac tgctgatcta ttgggcaagc      240
accaggaat ctggagtgcc cgaccggttc agcggttctg gcagtggaac agattttacc      300

```

15

ctgacaattt catccctgca agccgaggac gtggctgtct actattgtca gcagtactat 360
 acttaccacac tgaccttcgg cggaggacc aagctcgaga tcaaacgtac ggtcgcggcg 420
 ccttctgtgt tcattttccc cccatctgat gaacagctga aatctggcac tgcttctgtg 480
 gtctgtctgc tgaacaactt ctaccctaga gaggccaaag tccagtggaa agtggacaat 540
 gctctgcaga gtgggaattc ccaggaatct gtcactgagc aggactctaa ggatagcaca 600
 tactccctgt cctctactct gacactgagc aaggctgatt acgagaaaca caaagtgtac 660
 gcctgtgaag tcacacatca ggggctgtct agtcctgtga ccaaactcct caatagggga 720
 gagtgtgat agtaaaagct t 741

<210> 20
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 20
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

10

<210> 21
 <211> 741
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <221> fuente
 <222> 1...741
 <223> /tipo de molécula = "otro ADN"
 /organismo = "Homo sapiens"

20

<400> 21

ES 2 808 947 T3

gcggccgcca tgaattttgg actgaggctg attttcctgg tgctgaccct gaaaggcgtc 60
 cagtgtgaca tcgtgatgac acagtcacct gattccctgg cagtcagtct gggcgagaga 120
 gccactatta actgcaagtc cagccagtct ctgctgtact ctagtaacca gaaaaattat 180
 ctggcttggc accagcagaa gccagggcag cccctaaac tgctgatcta ctgggcaagc 240
 accagggaat ctggagtgcc cgaccggttc agcggttctg gcagtggaac agattttacc 300
 ctgacaattt catccctgca agccgaggac gtggctgtct actattgtca gcagtactat 360
 acttatccac tgaccttggc cggagggacc aagctcgaga tcaaacgtac ggtcgcggcg 420
 ccttctgtgt tcattttccc cccatctgat gaacagctga aatctggcac tgcttctgtg 480
 gtctgtctgc tgaacaactt ctaccctaga gaggccaaag tccagtggaa agtggacaat 540
 gctctgcaga gtgggaattc ccaggaatct gtcactgagc aggactctaa ggatagcaca 600
 tactccctgt cctctactct gacactgagc aaggctgatt acgagaaaca caaagtgtac 660
 gcctgtgaag tcacacatca ggggctgtct agtcctgtga ccaaatcctt caatagggga 720
 gagtgtgat agtaaaagct t 741

<210> 22
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 22
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

10

<210> 23
 <211> 741
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <221> fuente

<222> 1...741
 <223> /tipo de molécula = "otro ADN"
 /organismo = "Homo sapiens"

5 <400> 23
 ggggcccga tgaattttgg actgaggctg attttctctgg tgctgacct gaaaggcgtc 60
 cagtgtgaca tcgtgatgac acagtcacct gattccctgg cagtctccct gggcgagaga 120
 gccactatga gttgcaagtc cagccagtct ctgctgtact ctagtaacca gaaaaattat 180
 ctggcttggc accagcagaa gccagggcag cccctaaac tgctgatcta ctgggcaagc 240
 accaggggat ctggagtgcc cgaccgggtc agcggttctg gcagtggaac agattttacc 300
 ctgacaattt catccctgca agccgaggac gtggctgtct actattgtca gcagtactat 360
 acttatccac tgaccttcgg cggagggacc aagctcgaga tcaagcgtac ggtcgcggcg 420
 ccttctgtgt tcattttccc cccatctgat gaacagctga aatctggcac tgcttctgtg 480
 gtctgtctgc tgaacaactt ctaccctaga gaggccaaag tccagtggaa agtggacaat 540
 gctctgcaga gtgggaattc ccaggaatct gtcactgagc aggactctaa ggatagcaca 600
 tactccctgt cctctactct gacactgagc aaggctgatt acgagaaaca caaagtgtac 660
 gcctgtgaag tcacacatca ggggctgtct agtcctgtga ccaaatcctt caatagggga 720
 gagtgtgat agtaaaagct t 741

<210> 24
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 24
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Thr Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 25

ES 2 808 947 T3

<211> 741
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1...741
 <223> /tipo de molécula = "otro ADN"
 /organismo = "Homo sapiens"

10 <400> 25
 gcggccgcca tgaatdddgg actgaggctg atdddctgg tgctgaccct gaaagggctc 60
 cagtgtgaca tcgtgatgac acagtcacct gattccctgg cagtctccct gggcgagaga 120
 gccactatga gttgcaagtc cagccagtct ctgctgtact ctagtaacca gaaaaattat 180
 ctggcttggc accagcagaa gccaggacag ccccctaaac tgctgatcta ctgggcaagc 240
 accaggggat ctggcgtgcc cgaccggttc agcggctctg gaagtgggac agatdddacc 300
 ctgacaatct catccctgca agccgaggac ctggctatct actattgtca gcagtactat 360
 acttatccac tgaccttcgg tgccggcacc aagctcgaga tcaaactac ggtcgcggcg 420
 ccttctgtgt tcatdddccc cccatctgat gaacagctga aatctggcac tgcttctgtg 480
 gtctgtctgc tgaacaactt ctaccctaga gaggccaaag tccagtggaa agtggacaat 540
 gctctgcaga gtgggaattc ccaggaatct gtcactgagc aggactctaa ggatagcaca 600
 tactccctgt cctctactct gacactgagc aaggctgatt acgagaaaca caaagtgtac 660
 gcctgtgaag tcacacatca ggggctgtct agtcctgtga ccaaatcctt caatagggga 720
 gagtgtgat agtaaaagct t 741

15 <210> 26
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 26
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

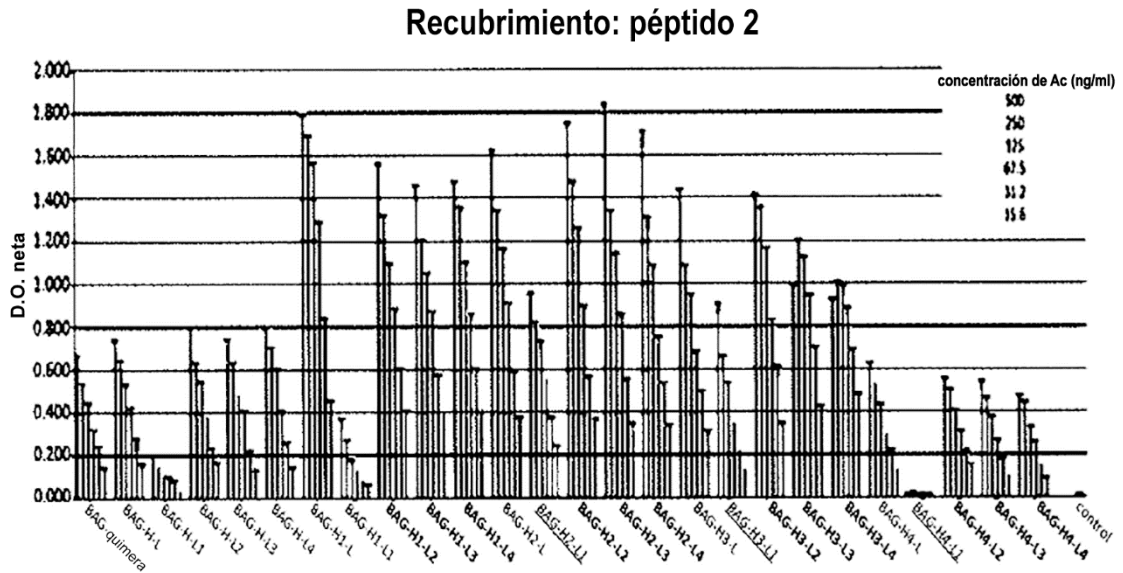
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que se une a la proteína BAG3 y que comprende:
 - 5 a) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada como se muestra en SEQ ID N. 12 o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % con la misma, y
 - 10 b) una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera como se muestra en SEQ ID N. 20 o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % con la misma,

caracterizado en que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % con la misma comprende las regiones CDR que tienen la siguiente composición de aminoácidos: H-CDR1 comprende los aminoácidos GFNIKDTYMY (SEQ ID N. 3), H-CDR2 comprende los aminoácidos GVDPANGNTRYDPKFQG (SEQ ID N. 4), H-CDR3 comprende los aminoácidos DGAMDY (SEQ ID N. 5) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera o al menos el dominio variable de la misma o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % con la misma, comprende las regiones CDR que tienen la siguiente composición de aminoácidos: L-CDR1 comprende los aminoácidos KSSQSLLYSSNQKNYLA (SEQ ID N. 6), L-CDR2 comprende los aminoácidos WASTRES (SEQ ID N. 7) y L-CDR3 comprende los aminoácidos QQYYTYPLT (SEQ ID N. 8).
- 25 2. Anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la reivindicación 1, **caracterizado en que** dicha secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % con respecto a SEQ ID N. 12 se selecciona de SEQ ID N. 14, SEQ ID N. 16 o SEQ ID N. 18.
- 30 3. Anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la reivindicación 1, **caracterizado en que** dicha secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % con respecto a SEQ ID N. 20 se selecciona de SEQ ID N. 22, SEQ ID N. 24 o SEQ ID N. 26.
- 35 4. Anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones previas, **caracterizado en que** la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en SEQ ID NO. 18 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO 22 o SEQ ID N. 26.
- 40 5. Anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones previas, **caracterizado en que** es un anticuerpo de origen natural o sintético, preferiblemente un anticuerpo de origen mamífero.
- 45 6. Anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones previas, **caracterizado en que** dicho anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab'), un fragmento Fv, un diacuerpo, un fragmento scFv, un inmunofármaco modular pequeño (SMIP).
7. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Un vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 7.
9. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7 o el vector de la reivindicación 8.
- 50 10. Anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones previas para uso como un medicamento.
- 55 11. Anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo para uso según la reivindicación 10, en el tratamiento de un estado patológico que implica la activación de macrófagos, seleccionado de enfermedades neoplásicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunitarias y/o enfermedades degenerativas.
- 60 12. Anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo para uso según la reivindicación 11, en el tratamiento de una enfermedad neoplásica, seleccionada de tumor pancreático o tumor de vejiga, más preferiblemente tumor pancreático.
13. Composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo o fragmento del mismo según las reivindicaciones 1 a 6 y al menos un excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

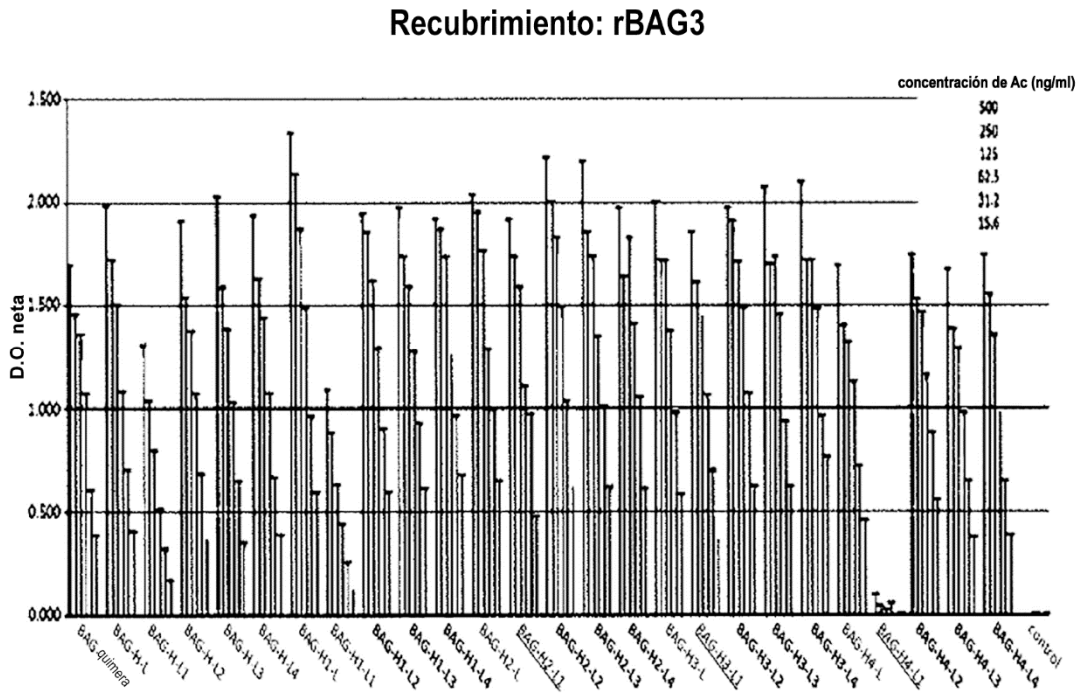
14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13 **caracterizada en que** dicha composición se puede formular en una forma adecuada para la administración oral o en una forma adecuada para la administración parenteral o tópica.
- 5 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 13 **caracterizada en que** comprende un principio activo adicional, seleccionado de antimetabolitos, camptotecinas o taxanos, preferiblemente gemcitabina, 5-fluorouracilo, irinotecano, oxaliplatino, paclitaxel unido a albúmina, capecitabina, cisplatino, paclitaxel, docetaxel o liposomas de irinotecano.

Figura 1. ELISA que muestra el cribado para actividad de unión de anticuerpo con un recubrimiento usando el péptido 2 (fragmento de BAG3).



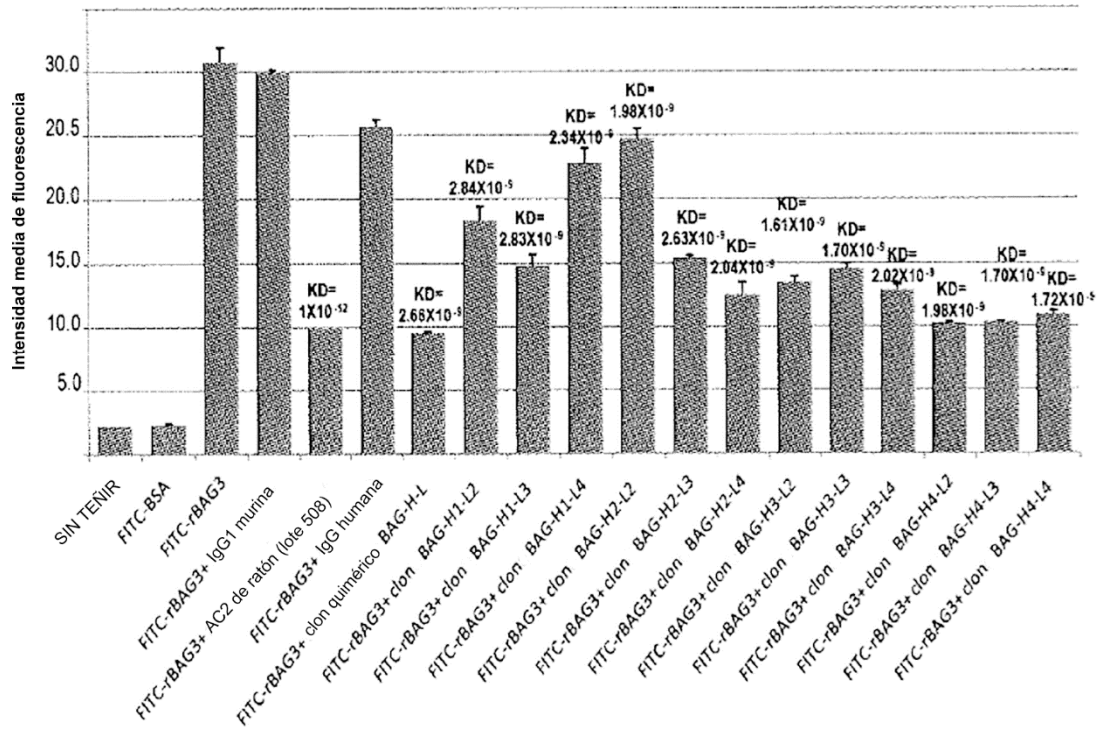
En negrita se indican los anticuerpos elegidos para análisis adicional.

Figura 2. ELISA que muestra el cribado para actividad de unión de anticuerpo con un recubrimiento usando la proteína BAG3 de longitud completa recombinante.



En negrita se indican los anticuerpos elegidos para análisis adicional.

Figura 3. Evaluación por citometría de flujo de la capacidad de las variantes del anticuerpo para bloquear la unión de BAG3 a la superficie de macrófagos.



Los números encima de las columnas indican la KD para el anticuerpo indicado.

Figura 4. Efecto de las variantes humanizadas del anticuerpo AC-2 sobre crecimiento tumoral *in vivo*.

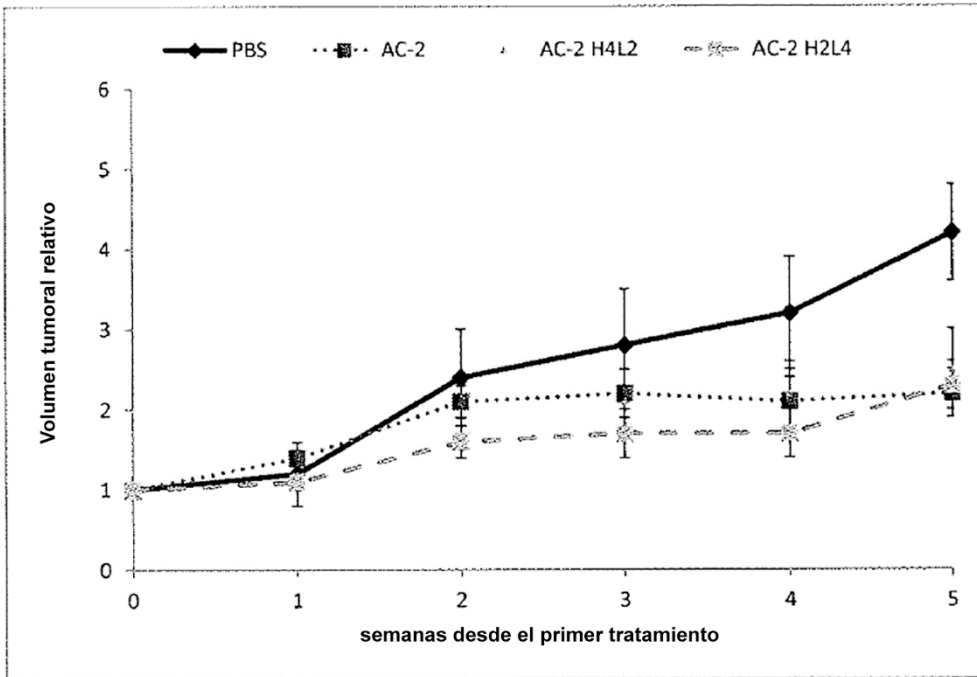


Figura 5. Efecto de la variante humanizada H2L4 del anticuerpo AC-2 sobre fibroblastos activados dentro de la masa tumoral.

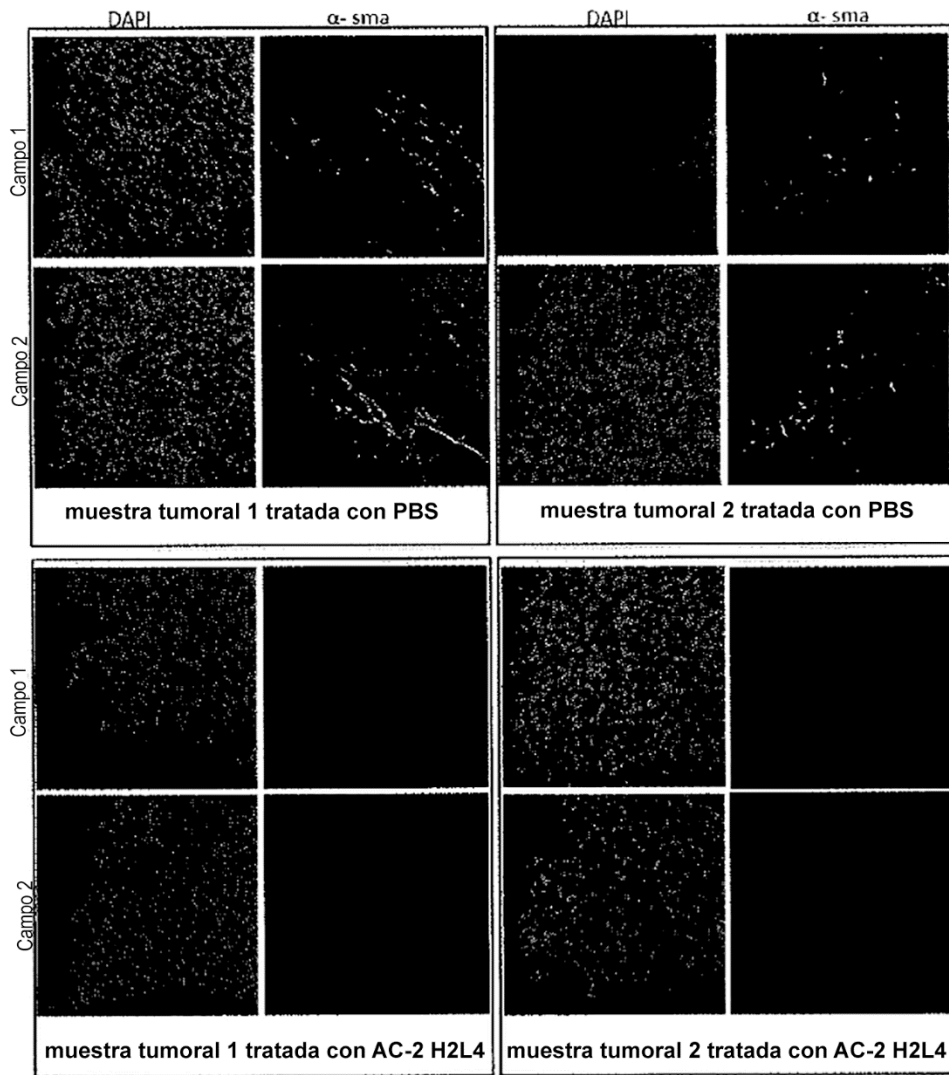


Figura 6. Cuantificación del efecto de AC-2 H2L4 sobre el número de fibroblastos activados.

