

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 340**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18	(2006.01)	G01N 33/574	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)	G01N 33/577	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)	C07K 1/20	(2006.01)
C12N 5/20	(2006.01)	C12N 5/10	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)	C12N 15/79	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 37/00	(2006.01)		
A61K 47/48	(2006.01)		
G01N 33/53	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2004 E 09003983 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2070947**

54 Título: **Anticuerpos anti hsp70 terapéuticos y diagnósticos**

30 Prioridad:

05.12.2003 EP 03028144

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

11.08.2014

73 Titular/es:

**MULTIMMUNE GMBH (100.0%)
Arnulfstrasse 197
80634 München, DE**

72 Inventor/es:

MULTHOFF, GABRIELE

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 484 340 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 anti hsp70 terapéuticos y diagnósticos

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para la detección, prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades neoplásicas primarias y metastásicas, incluyendo, pero sin limitaciones, leucemia, sarcomas y carcinomas humanos. Según la presente invención, la práctica de la detección, 10 prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer está mediada y/o indicada por la presencia y localización de determinados marcadores tumorales sobre la superficie celular de tejidos o células patológicas. En particular, la presente invención se refiere a anticuerpos y moléculas de unión al antígeno que son capaces de unirse a un epítipo de la proteína de choque térmico Hsp70 que se localiza extracelularmente sobre las células tumorales. Adicionalmente, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden dichos anticuerpos y 15 su uso en procedimientos de diagnóstico y que permiten tratar enfermedades relacionadas con la respuesta inmune y de otro tipo, como tumores. La presente invención además se refiere al uso de un anticuerpo capaz de reconocer la proteína Hsp70 unida a membrana o un dominio de unión de la misma para la detección y/o el tratamiento de un tumor o enfermedad infecciosa.

20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las proteínas de choque térmico (Hsp) son moléculas altamente conservadas que median en la protección frente al daño mortal después de diversos estímulos de estrés en células procariotas y eucariotas. Además, en condiciones fisiológicas ayudan al plegamiento de proteínas no nativas o con plegamiento erróneo y previenen la 25 agregación durante la proliferación y diferenciación celular (Hartl y Hayer-Hartl, Science 295 (2002), 1852-1858. El grupo de las moléculas carabina o chaperonas mejor caracterizadas pertenecen a la familia de Hsp70. Al igual que otras proteínas de estrés, las Hsp70 son más eficaces si funcionan de acuerdo con cofactores como maquinarias de las moléculas carabinas celulares. Junto con las cochaperonas de dominio J (es decir, Hsp40), mantienen el plegamiento de proteínas y ayudan en la translocación a través de la membrana (Pilon y Schekman, Cell 97 (1999), 30 679-682). Las proteínas de choque térmico (HSP) también pueden ser inducidas por procesos fisiológicos, como la diferenciación y el desarrollo celular (Lindquist y Craig, Annu. Rev. Genet. 22 (1988), 631). Las HSP intracelulares funcionan no solo como chaperones moleculares, sino que también están implicadas en el procesamiento y presentación de antígenos (DeNagel y Pierce, Immunol. Today 13 (1992), 86; Hartl y col., Nature 381 (1996), 571). También se ha demostrado que las HSP con un peso molecular de 70 y 90 kDa funcionan como proteínas 35 transportadoras para péptidos derivados de tumores inmunogénicos que inducen una respuesta inmune mediada por células T frente al cáncer (Tamura y col., Science 278 (1997), 117; Schild y col., Current Opinion in Immunology 11 (1999), 109; Srivastava y col., Immunity 8 (1998), 657). Las células presentadoras de antígeno son clave para la captación mediada por receptor de complejos HSP-péptido (Arnold-Schild y col., J. Immunol. 162 (1999), 3757). Varios grupos han publicado una inusual localización de las HSP en la membrana plasmática de células tumorales 40 (Altmeyer y col., Int. J. Cancer 69 (1996), 340; Ferrarini y col., Int. J. Cancer 51 (1992), 613; Piselli y col., J. Biol. Regul. Homeost Agents 9 (1995), 55; Tamura y col., J. Immunol. 151 (1993), 5516). Los inventores fueron los primeros en demostrar que las células NK también deben considerarse como células efectoras importantes para el reconocimiento de Hsp70 unida a membrana en las células tumorales (Multhoff y col., Blood 86 (1995a), 1374; Multhoff y col., Int. J. Cancer 61 (1995b), 272; Multhoff y col., J. Immunol. 158 (1997), 4341; Botzler y col., Cancer 45 Immunol. Immunother. 43 (1996a), 226; Botzler y col., Int. J. Cancer 65 (1996b), 633). Con respecto a estos hallazgos y debido al hecho de que las células normales no expresan Hsp70 en la membrana plasmática, podría especularse que Hsp70 actúa como una estructura de reconocimiento selectivo del tumor por las células NK. Los estudios de bloqueo con anticuerpos mostraron que Hsp70 es una estructura de reconocimiento importante para células NK que se adhieren de forma transitoria al plástico (Multhoff y col., Blood 86 (1995a), 1374; Multhoff y col., 50 Int. J. Cancer 61 (1995b), 272; Multhoff y col., J. Immunol. 158 (1997), 4341; Botzler y col., Cell Stress & Chaperones 3 (1998), 6).

[0003] Se ha demostrado recientemente que la proliferación y la actividad citolítica de las células NK frente a las células tumorales que expresan Hsp70 podían estimularse con proteína Hsp70 recombinante pero no con Hsc70 o 55 DnaK (Multhoff y col., Exp. Hematology 27 (1999), 1627). Como células diana para la actividad citolítica de las células NK se usaron las sublíneas tumorales CX+ y CX- con un patrón de expresión de MHC y moléculas de adhesión idéntico, pero que difieren en cuanto a la capacidad para expresar Hsp70 en la membrana plasmática (Multhoff y col., J. Immunol. 158 (1997), 4341).

[0004] Como se describe anteriormente, la presencia y localización de Hsp70 sobre la superficie celular de tejidos o células enfermas, en particular sobre células tumorales, proporciona un marcador valioso y una diana para la intervención terapéutica. Por tanto, es altamente deseable contar con anticuerpos u otras moléculas de unión que reconozcan específicamente epítopos extracelulares de Hsp70 en dichos tejidos y células.

[0005] Aunque hay disponibles en el mercado varios anticuerpos dirigidos frente a Hsp70 y se han descrito en la literatura, parece que estos no son capaces y/o son poco fiables a la hora de detectar Hsp70 unida a membrana sobre la superficie de las células. Los inventores probaron la capacidad de un panel de estos anticuerpos para detectar Hsp70 unida a la membrana plasmática. La mayoría de los anticuerpos probados no eran adecuados para esta tarea (SPA-820, Stressgen; H553220-clon7; BD Pharmingen; clon H5147 BRM-22; Sigma; policlonal 0A500, Dako; clon MS-482 W27, NeoMarkers), mientras que otros proporcionaron resultados conflictivos.

[0006] Los anticuerpos anti-Hsp70 de Affinity Bioreagents (MA3-006 y MA3-009) mostraron especificidades diferentes para lotes diferentes. Algunos lotes eran adecuados para la detección de Hsp70 en la membrana plasmática hasta un grado determinado (Botzler y col., Cell Stress & Chaperones 3 (1998), 6) aunque los lotes recientes no mostraron reactividad con Hsp70 localizada en la superficie celular de las células tumorales. De forma similar, se ha descrito que el clon C92F3A-5 comercializado por Stressgen Inc. como SPA-810 y por MBL, Japón, como SR-B810 reacciona con Hsp70 localizada en la superficie celular en algunas ocasiones (Barreto y col., Cell. Immunol. 222 (2003), 97-104; Feng y col., Blood 100 (2002), 4108-4115), pero los inventores no fueron capaces de repetir los resultados publicados. En la publicación de Feng y col., la Hsp70 de la superficie celular se detectaba solo en células apoptóticas, lo que puede ser debido a anticuerpos que entran en células apoptóticas en degradación cuya membrana celular ya no está intacta y detectan Hsp70 intracelular. Los conflictivos resultados de Barreto y col. y de otros investigadores podrían además deberse a diferencias en la calidad de los lotes usados para los respectivos experimentos. Tampoco existen publicaciones sobre la unión a Hsp70 de la superficie celular más allá de la del anticuerpo comercializado por MBL.

[0007] La pérdida o cambio de especificidad de un anticuerpo monoclonal también puede deberse a que la línea celular de hibridoma que produce dicho anticuerpo no se ha derivado de una única línea celular. Una mezcla de dos o más hibridomas diferente producirá una mezcla de dos o más anticuerpos monoclonales con especificidad diferente. La relación de las células dentro del cultivo y, por tanto, la relación entre los diferentes anticuerpos monoclonales producidos por ellos puede variar durante el cultivo. Además, un hibridoma en particular que produce el anticuerpo con la especificidad deseada podría desaparecer de la mezcla si las otras células de hibridoma presentan una ventaja evolutiva. La mezcla de hibridomas en el cultivo también puede ser resultado de mutaciones en determinadas células que lleven a un cambio en las especificidades de los anticuerpos producidos.

[0008] Por tanto, existe la necesidad de una fuente fiable de anticuerpos anti-Hsp70 capaces de detectar epítopos extracelulares de Hsp70 y permitiendo, de este modo, la detección y tratamiento específico de células tumorales o células infectadas por un patógeno.

[0009] La solución a dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y descritas con más detalle a continuación.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] La presente invención se refiere al campo técnico de la inmunología y al tratamiento de enfermedades mediadas y/o indicadas por la presencia y localización de determinados marcadores tumorales sobre la superficie celular de tejidos o células enfermas. La presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se caracteriza en la reivindicación 1 que se une a un epítipo de Hsp70 que se localiza extracelularmente sobre las células tumorales.

[0011] Especialmente, la presente invención se refiere al anticuerpo monoclonal cmHsp70.1 tal y como lo produce el hibridoma cmHsp70.1, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 14 de noviembre de 2003, y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2629 y al cmHsp70.2, así como al hibridoma que lo produce, cmHsp70.2, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) el 14 de noviembre de 2003 y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2630.

[0012] En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado, xenogénico o quimérico

humano-murino. Las composiciones terapéuticas que incluyen el anticuerpo o fragmentos activos del mismo, o agonistas y moléculas relacionadas, o alternativamente, antagonistas de los mismos, y procedimientos de uso de dichas composiciones en la prevención, diagnóstico o tratamiento de enfermedades tumorogénicas o infecciosas usando estas composiciones también están incluidas, en las que una cantidad eficaz de la composición se administra a un paciente que necesita de dicho tratamiento. Sin embargo, para sus usos diagnósticos y en investigación se prefieren también, en general, anticuerpos murinos.

[0013] El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal puede ser un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂ y cualquier otro fragmento de unión a antígeno. En una realización específica, más abajo, el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo es un anticuerpo murino de isotipo IgG o IgM.

[0014] Naturalmente, la invención abarca el hibridoma que produce el anticuerpo cmHsp70.1 o el cmHsp70.2, cuyo hibridoma está depositado en la DSMZ como se indica anteriormente en este documento.

[0015] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican la región variable de ambas cadenas de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Dicha región variable comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables V_H y V_L del anticuerpo cmHsp70.1 o cmHsp70.2.

[0016] Por consiguiente, la presente invención también abarca vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células huésped transformadas con estos, así como su uso para la producción de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a epítopes localizados a nivel extracelular de Hsp70 en células intactas, en células tumorales en particular, o un fragmento funcional o cadenas de inmunoglobulina del mismo.

[0017] También es objeto de la invención proporcionar moléculas bi o multifuncionales que comprenden un dominio de unión de un anticuerpo, una cadena de inmunoglobulina o un fragmento de unión de la presente invención, que se une a la proteína de choque térmico (HSP) unida a la membrana de la superficie celular, y al menos un dominio funcional adicional.

[0018] El anticuerpo, las cadenas de inmunoglobulina, los fragmentos de unión del mismo y los ligandos distintos a Hsp70 que se unen a dicho anticuerpo pueden usarse en composiciones farmacéuticas o diagnósticas para modular y detectar una respuesta inmune o para la detección y/o tratamiento de un tumor.

[0019] Adicionalmente, se proporcionan procedimientos para determinar un tumor que comprende las células de ensayo en una muestra de un paciente con el anticuerpo o la molécula bi o multifuncional según la invención, en el que la presencia o aumento de Hsp70 localizada a nivel extracelular es indicativo del tumor, y para el tratamiento de un tumor o la modulación de la respuesta inmune en un sujeto que lo necesita, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo o molécula bi o multifuncional.

[0020] Se prefiere el uso de las composiciones anteriores en la preparación de un medicamento. En realizaciones preferidas, el medicamento es útil en el tratamiento de afecciones relacionadas con un tumor o una enfermedad infecciosa.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021]

Figura 1: El anticuerpo anti-Hsp70 de la invención bloquea la actividad citolítica de las células NK activadas (NKd3). En la figura 1 se muestra el resultado de un experimento representativo con el anticuerpo monoclonal cmHsp70.1. Se usaron como células efectoras células NK estimuladas (NKd3) o no estimuladas (NKd0) en proporciones E:T que oscilaban de 20:1 a 2:1. Las células NK no estimuladas (NKd0) mostraban solo una lisis débil de las células tumorales CX+ y CX-, a diferencia de las células NK activadas (NKd3) con Hsp70 que mostraban una lisis significativa de las células tumorales CX+ pero solo una lisis débil de las células diana tumorales CX-. Tras la incubación previa de las células diana tumorales CX+ y CX- con anticuerpo específico para Hsp70 (5 µg/ml) durante 1 h y, a continuación, usarse como células diana en un ensayo de liberación de Cr-51 de 4 h, la lisis de las células tumorales CX+ (gráfica izquierda) podía bloquearse por completo mediante el anticuerpo Hsp70, mientras que la lisis de las células diana CX- (gráfica derecha) seguía sin verse afectada. Los datos representan los valores medios de tres experimentos independientes +/- DT.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0022] La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades neoplásicas primarias y metastásicas y enfermedades infecciosas y para inducir una respuesta inmune en un individuo humano. En particular, la presente invención se refiere a moléculas como se caracteriza en la reivindicación 1 que se unen a un epítipo localizado a nivel extracelular de Hsp70 en células tumorales, especialmente células tumorales intactas. Más específicamente, la presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que muestran las características inmunológicas de unión del anticuerpo monoclonal cmHsp70.1 tal y como lo produce el hibridoma cmHsp70.1, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 14 de noviembre de 2003, y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2629, o cmHsp70.2 producido por el hibridoma cmHsp70.2, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) el 14 de noviembre de 2003 y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2630. Cuando se presenta, el término «características inmunológicas de unión» u otras características de unión de un anticuerpo con un antígeno, en todas sus formas gramaticales, se refiere a la especificidad, afinidad, reactividad cruzada y otras características de unión de un anticuerpo.

[0023] Como se mencionó antes, aunque existen varios anticuerpos específicos de Hsp70, solo en dos de ellos se ha descrito que reconozcan ocasionalmente un epítipo que está localizado a nivel extracelular. La falta de unión al Hsp70 unida a la membrana plasmática por su epítipo extracelular podría ser debido a su inestabilidad, a la calidad variable del anticuerpo o a su necesidad de condiciones de unión muy específicas que no siempre se dan.

[0024] Sin embargo, es necesario que los anticuerpos con fines diagnósticos y/o terapéuticos funcionen de forma fiable en las diversas condiciones que se dan en los laboratorios de rutina y deben estar producidos por una fuente estable, es decir, una línea celular de hibridoma.

[0025] La presente invención proporciona dos líneas de hibridomas y los anticuerpos que producen. Se encontró sorprendentemente que ambos anticuerpos purificados son capaces de unirse a Hsp70 localizada en la membrana plasmática a través de un epítipo extracelular. Puesto que parece que solo las células humanas transformadas e infectadas, respectivamente, expresan Hsp70 sobre su superficie celular, los anticuerpos según la invención son capaces de distinguir entre células normales y tumorales. Por tanto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se caracteriza en la reivindicación 1, que se une a un epítipo localizado a nivel extracelular de Hsp70 en células tumorales, lo que da lugar a varias realizaciones descritas en este documento.

[0026] Puesto que la expresión de Hsp70 sobre la superficie celular es el rasgo característico de varios tipos diferentes de cáncer, véase *supra*, mientras que no aparece en la membrana plasmática de las células normales (Multhoff y col., Int. J. Cancer 61 (1995b), 272), una realización preferida del anticuerpo de la presente invención es que se unen a la célula tumoral, donde dicho tumor es un tumor humano seleccionado entre el grupo compuesto por cáncer de colon, pulmón, estómago, páncreas, cabeza y cuello, ovario y/o mama, melanoma, glioblastoma, sarcoma, blastocitoma y/o neoplasias malignas hematológicas que normalmente están fuertemente correlacionadas con el tipo de tumor y pueden tener una función en los primeros estadios del inicio del tumor, estas neoplasias malignas hematológicas comprenden leucemia mieloide aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD), trastornos mieloproliferativos (TMP), leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfomas como el linfoma de Burkitt, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin y no-Burkitt y trastornos linfoproliferativos (TLP), es decir trastornos de estirpe B y T.

[0027] Los anticuerpos de la presente invención reconocen un epítipo que comprende o consta de la secuencia de aminoácidos NLLGRFEL (SEC ID N.º 1) o TKDNNLLGRFELSG (SEC ID N.º 2). Se demostró que los péptidos de SEC ID N.º 1 y 2 estaban presentes en el lado extracelular de la membrana plasmática cuando Hsp70 se localiza sobre la superficie celular e inhibe la unión de anticuerpos según la invención en forma dependiente de la dosis. Más preferiblemente, dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En particular, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención preferiblemente muestra las características inmunológicas de unión del anticuerpo monoclonal cmHsp70.1 tal y como lo produce el hibridoma cmHsp70.1, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 14 de noviembre de 2003, y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2629 o cmHsp70.2 tal y como lo produce el cmHsp70.2, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) el 14 de noviembre de 2003 y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2630. Las características inmunológicas de unión del anticuerpo monoclonal cmHsp70.1 son sustancialmente las mismas que

las del anticuerpo RPN1197 descrito *inter alia* en la solicitud internacional de patente WO02/22656; véanse especialmente los ejemplos. Sin embargo, mientras que en la solicitud internacional WO02/22656, así como en otras publicaciones de los inventores, p. ej., Botzler y col., Cell Stress & Chaperones 3 (1998), 6-11, se describen las características inmunológicas deseadas de un anticuerpo de la presente invención, especialmente que los anticuerpos son capaces de unirse a células tumorales viables que expresan Hsp70 (CX+) y, preferiblemente, también inhiben sustancialmente la lisis de células CX+, la presente invención por primera vez permite la provisión ilimitada de dichos anticuerpos y fuentes fiables, en particular las correspondientes líneas celulares de hibridoma. Por tanto, la provisión de los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales cmHsp70.1 y cmHsp70.2, respectivamente, permite al experto en la materia diseñar y producir anticuerpos con funcionalidad equivalente, por ejemplo, adaptando el sitio de unión a antígeno de cualquier de los anticuerpos mencionados.

[0028] Cada uno de los dos anticuerpos proporcionados específicamente es único con respecto a sus respectivas actividades inmunológicas y biológicas. Ambos pueden distinguirse de otros anticuerpos anti-Hsp70 por su capacidad de unión a epítopes extracelulares de Hsp70, en particular en células tumorales intactas y viables. También son capaces de mostrar un efecto inhibitorio de la actividad citolítica de células NK frente a células tumorales que expresan Hsp70; véase la figura 1. Por tanto, las moléculas que se unen a Hsp70 derivadas de cmHsp70.1 o de cmHsp70.2 se usan preferiblemente, pero sin limitaciones, para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.

[0029] Además, en una realización los anticuerpos de la presente invención se caracterizan preferiblemente porque de 0,1 a 10 µg/ml, preferiblemente menos de 5 µg/ml y más preferiblemente de 0,1 a 1 µg/ml del anticuerpo de la invención es suficiente para la detección de células tumorales CX seguida de marcaje con proteína A (Aurion 10 µm) y visualizado en un microscopio electrónico EM 10CR de Zeiss; véanse los detalles experimentales, p. ej., en Botzler y col., Cell Stress & Chaperones 3 (1998), 6-11. Además, los anticuerpos de la presente invención **se caracterizan preferiblemente porque** son capaces de bloquear la actividad citolítica de células NK activadas, véase la figura 1. En estos experimentos normalmente de 1 a 20 µg/ml, preferiblemente de 5 a 10 µg/ml, y más preferiblemente aproximadamente o menos de 5 µg/ml del anticuerpo en cuestión es suficiente para obtener los mismos resultados como se describe en la figura 1.

[0030] Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno, que compite por la unión a un epítipo extracelular de Hsp70 con un anticuerpo proporcionado por la presente invención. Estos anticuerpos pueden ser también murinos; sin embargo, se prefieren anticuerpos humanos, humanizados, xenogénicos y quiméricos humano-murino, en particular para aplicaciones terapéuticas. Un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂. Por tanto, para algunas aplicaciones solo son necesarias las regiones variables de los anticuerpos, las cuales pueden obtenerse tratando el anticuerpo monoclonal aislado del hibridoma con reactivos adecuados de modo que se generen porciones Fab', Fab o F(ab')₂. Estos fragmentos son suficientes para su uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que implican conjugar las porciones inmunoespecíficas de las inmunoglobulinas con reactivos de detección como radioisótopos.

[0031] De forma natural, la invención se extiende también al hibridoma que produce anticuerpos según la invención. Por tanto, de forma ventajosa, la invención proporciona una fuente celular de un anticuerpo monoclonal de la invención que se prolonga indefinidamente: el hibridoma. Especialmente, se prefiere un hibridoma seleccionado a partir del grupo compuesto por el hibridoma cmHsp70.1, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 14 de noviembre de 2003, y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2629 o el cmHsp70.2, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) el 14 de noviembre de 2003 y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2670.

[0032] Como alternativa a la obtención de inmunoglobulinas directamente a partir de los cultivos de hibridomas, pueden usarse las células de hibridoma inmortalizadas como fuente de *loci* de la cadena pesada y de la cadena ligera reorganizadas para su posterior expresión y/o manipulación genética. Los genes de anticuerpos reorganizados pueden transcribirse de forma inversa a partir de los ARNm apropiados para obtener ADNc. Si se desea, la región constante de la cadena pesada puede intercambiarse por la de un isótopo diferente o eliminarse por completo. Las regiones variables pueden ligarse para codificar regiones Fv de cadena sencilla. Pueden ligarse múltiples regiones Fv para conferirles capacidad de unión a más de una diana o pueden emplearse combinaciones químicas de cadenas pesadas y ligeras. Una vez que se disponga del material genético, es fácil diseñar análogos como se ha descrito anteriormente que retengan ambas capacidades de unión a la diana deseada. Los procedimientos para el clonaje de regiones variables de anticuerpos y la generación de anticuerpos recombinantes son bien conocidos por

los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Gilliland y col., *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke y col., *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

[0033] Según lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica al menos la región variable de ambas cadenas de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. Dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de V_H y/o V_L de la región variable del anticuerpo producido por uno cualquiera de los hibridomas descritos anteriormente. El experto en la materia sabe que cada dominio variable (la región V_H de la cadena pesada y la región V_L de la cadena ligera) de un anticuerpo comprende tres regiones hipervariables, denominadas en ocasiones regiones determinantes de complementariedad o «CDR» flanqueadas por cuatro regiones estructurales relativamente conservadas o «FR». Las CDR contenidas en las regiones variables del anticuerpo de la invención pueden determinarse, por ejemplo, según Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (U.S. Department of Health and Human Services, tercera edición, 1983, cuarta edición, 1987, quinta edición 1990 y sus actualizaciones). El experto en la materia apreciará con facilidad que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable descrito anteriormente puede usarse para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad y función biológica deseadas. Por tanto, la presente invención también abarca polipéptidos y anticuerpos que comprenden las CDR del dominio variable descrito anteriormente y que tienen sustancialmente las mismas, o similares, propiedades de unión que el anticuerpo descrito anteriormente en este documento. El experto en la materia apreciará fácilmente que usando los dominios variables o CDR descritos en este documento pueden construirse anticuerpos según los procedimientos conocidos en la técnica, p. ej., como se describe en los documentos EP-A1 0 451 216 y EP-A1 0 549 581. Además, el experto en la materia sabe que la afinidad de unión puede aumentarse realizando sustituciones de aminoácidos en las CDR o dentro de los lazos hipervariables (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917) que solapan parcialmente con las CDR como definió Kabat. Por tanto, la presente descripción también se refiere a anticuerpos en los que una o más de las CDR mencionadas comprenden uno o más, preferiblemente no más de dos sustituciones de aminoácidos.

[0034] El polinucleótido de la invención que codifica el anticuerpo descrito anteriormente puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN o ADN o ARN obtenido mediante síntesis o una molécula de ácido nucleico quimérica obtenida mediante tecnología recombinante que comprende cualquiera de estos polinucleótidos solos o en combinación. Preferiblemente, dicho polinucleótido es parte de un vector. Estos vectores pueden comprender genes adicionales como genes marcadores que permitan la selección de dicho vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas.

[0035] Por tanto, es una realización preferida de la invención un vector que comprenda dicho polinucleótido, opcionalmente en combinación con un polinucleótido que codifique la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina de dicho anticuerpo.

[0036] Preferiblemente, el polinucleótido de la invención está unido de forma operativa a secuencias de control de la expresión que permiten su expresión en células procariontas o eucariotas. La expresión de dicho polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido en un ARNm traducible. Los elementos reguladores que garantizan la expresión en células eucariotas, preferiblemente células de mamífero, son bien conocidos para los expertos en la materia. Normalmente comprenden secuencias reguladoras que garantizan el inicio de la transcripción y, opcionalmente, señales de poli-A que garantizan la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Entre los elementos reguladores adicionales pueden incluirse potenciadores tanto de la transcripción como de la traducción, y/o regiones promotoras naturales o heterólogas.

[0037] A este respecto, el experto en la materia apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar los dominios variables de ambas cadenas de inmunoglobulina o solo de una. Asimismo, dichos polinucleótidos pueden estar bajo el control del mismo promotor o su expresión puede estar controlada de forma independiente. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procariontas comprenden, por ejemplo, el promotor P_L , lac, trp o tac en *E. coli*, y ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levaduras o el promotor de CMV, SV40 o RSV (virus del sarcoma de Rous), potenciador de CMV, potenciador de SV40 o un intrón de globina en células de mamífero y otros animales.

[0038] Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción, estos elementos reguladores pueden comprender señales de terminación de la transcripción, como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, después del extremo 5' del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión utilizado, pueden añadirse a la secuencia codificadora del polinucleótido de la invención secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido a un

compartimiento celular o secretarlo al medio y son bien conocidas en la técnica. Las secuencias líder se ensamblan en la fase apropiada con las secuencias de traducción, inicio y terminación y, preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una porción de la misma, en el espacio periplásmico y al medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluya un péptido de identificación C o N terminal que impartan las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. En este contexto, se conocen en la técnica vectores de expresión adecuados como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) o pSPORT1 (GIBCO BRL).

- 10 **[0039]** Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de su transformación o transfección en células huésped eucariotas, aunque también pueden usarse secuencias control de huéspedes procariontas. Una vez que el vector se haya incorporado al huésped apropiado, dicho huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión a alto nivel de las secuencias de nucleótidos y, si se desea, la recogida y purificación de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina, cadenas pesadas, dímero de cadena ligera y pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulinas; véase, Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979).

[0040] Una vez que se obtiene el material genético apropiado y, si se desea, se modifica para codificar un análogo, las secuencias codificadoras, incluyendo aquellas que codifican como mínimo las regiones variables de la cadena pesada y ligera, se insertan en un sistema de expresión apropiado, es decir, un vector que puede ser transfectado, el anticuerpo o su fragmento pueden expresarse mediante tecnología recombinante en células huésped. Pueden usarse varias de estas células huésped; sin embargo, para un procesamiento eficaz, se prefieren células de mamífero. Entre las líneas celulares de mamífero típicas para este fin se incluyen las células CHO, las células 293 o las células NSO.

25 **[0041]** Una célula huésped que comprende un polinucleótido o un vector según la invención es, por tanto, una realización preferida. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética. Además de un polinucleótido que codifica un dominio variable de una cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo de la invención, pueden comprender opcionalmente un polinucleótido de la invención que codifique el dominio variable de la otra cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia de genes o dirigido. Los vectores de expresión derivados de virus como retrovirus, virus vaccinia, virus adenoasociado, virus del herpes o virus del papiloma bovino, pueden usarse para administrar los polinucleótidos o el vector de la invención dentro de la población de células diana. Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir diversos virus recombinantes; véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). De forma alternativa, los polinucleótidos y los vectores de la invención pueden reconstituirse en liposomas para su administración a las células diana. Los vectores que contienen los polinucleótidos de la invención (p. ej., los dominios variables pesado y/o ligero de las cadenas de inmunoglobulina que codifican las secuencias y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse dentro de la célula huésped mediante procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de célula huésped. Por ejemplo, normalmente se utiliza la transfección con cloruro cálcico para las células procariontas, mientras que se puede utilizar el tratamiento con fosfato cálcico o electroporación para otras células huésped; véase Sambrook, *supra*.

45 **[0042]** La presente invención además se refiere a células huésped transformadas con un polinucleótido o vector de la invención. Dicha célula huésped puede ser una célula procarionta o eucariota. El polinucleótido o vector de la invención que está presente en la célula huésped puede estar integrado en el genoma de la célula huésped o puede mantenerse de forma extracromosómica. La célula huésped puede ser cualquier célula procarionta o eucariota, como células bacterianas, de insecto, de hongos, vegetales, animales o humanas. Las células fúngicas preferidas son, por ejemplo, las del género *Saccharomyces*, en particular las de la especie *S. cerevisiae*. El término «procarionta» pretende incluir a todas las bacterias que pueden transformarse o transfectarse con una molécula de ADN o ARN para la expresión de un anticuerpo de la invención o de las correspondientes cadenas de inmunoglobulina. Entre los huéspedes procariontas pueden incluirse tanto bacterias gram negativas como gram positivas como, por ejemplo *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. El término «eucariota» pretende incluir levaduras, plantas superiores, de insectos y preferiblemente células de mamífero, más preferiblemente células NSO y CHO. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los anticuerpos o cadenas de inmunoglobulina codificados por el polinucleótido de la presente invención pueden estar glucosilados o pueden no estar glucosilados. Los anticuerpos de la invención o las

correspondientes cadenas de inmunoglobulina también pueden incluir un resto del aminoácido metionina inicial. Puede usarse un polinucleótido de la invención para transformar o transfectar al huésped usando cualquiera de las técnicas normalmente conocidas por un experto en la materia. Además, los procedimientos para preparar genes de fusión, unidos de forma operativa y expresarlos en, por ejemplo, células de mamífero y bacterias son bien conocidos en la técnica (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Las construcciones genéticas y los procedimientos descritos en este documento pueden utilizarse para la expresión del anticuerpo de la invención o las correspondientes cadenas de inmunoglobulina en huéspedes eucariotas o procariotas. En general, los vectores de expresión que contienen secuencias promotoras que facilitan la transcripción eficaz del polinucleótido insertado se utilizan en conexión con el hospedador. El vector de expresión típicamente contiene un origen de replicación, un promotor y un terminador, así como genes específicos capaces de proporcionar una selección fenotípica de las células transformadas. Las células fuente adecuadas para las secuencias de ADN y las células huésped para la expresión y secreción de inmunoglobulinas pueden obtenerse a partir de diversas fuentes, como la American Type Culture Collection («Catalogue of Cell Lines and Hybridomas», quinta edición (1985) Rockville, Maryland, EE. UU.). Además, pueden usarse animales transgénicos no humanos, preferiblemente mamíferos, que comprendan las células de la invención para la producción a gran escala del anticuerpo de la invención.

[0043] La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo que se une a una epitope localizado a nivel extracelular de Hsp70 en las células tumorales o un fragmento funcional o cadenas de inmunoglobulina del mismo, comprendiendo dicho procedimiento

- a) cultivar una célula descrita anteriormente y
- b) aislar dicho anticuerpo, o fragmento funcional o cadenas de inmunoglobulina del mismo a partir del cultivo.

[0044] Los sistemas de expresión están diseñados preferiblemente para incluir péptidos señal de manera que los anticuerpos resultantes se secreten dentro del medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

[0045] Las células huésped transformadas pueden crecerse en fermentadores y cultivarse según métodos conocidos en la técnica para conseguir un crecimiento celular óptimo. Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, las cadenas pesadas y ligeras individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, puede purificarse según los procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares; véase, Scopes, «Protein Purification», Springer Verlag, N. Y. (1982). El anticuerpo o sus correspondientes cadenas de inmunoglobulina de la invención pueden aislarse a continuación a partir del medio de crecimiento, lisados celulares o fracciones de la membrana celular. El aislamiento y purificación de, por ejemplo, los anticuerpos o cadenas de inmunoglobulina expresadas en microorganismos de la invención puede hacerse mediante cualquier sistema convencional como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparatorias y separaciones inmunológicas como aquellas que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, por ejemplo, frente a la región constante del anticuerpo de la invención. Será aparente para los expertos en la materia que los anticuerpos de la invención pueden además estar conjugados con otros restos para, por ejemplo, aplicaciones de administración dirigida de fármacos y captación de imágenes. Esta conjugación puede conducirse químicamente tras la expresión del anticuerpo o el antígeno al lugar de unión o el producto conjugado producido puede introducirse mediante ingeniería genética en el anticuerpo o en el antígeno de la invención a nivel del ADN. A continuación los ADN se expresan en un sistema huésped adecuado y las proteínas expresadas se recogen y renaturalizan, si es necesario.

[0046] Se prefieren las inmunoglobulinas sustancialmente puras con al menos aproximadamente el 90 a 95% de homogeneidad, y son más preferidas aquellos con el 98 a 99% o más de homogeneidad para usos farmacéuticos. Una vez purificadas, parcialmente o hasta la homogeneidad deseada, los anticuerpos pueden usarse a continuación terapéuticamente (incluyendo de forma extracorpórea) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo.

[0047] La presente invención también implica un procedimiento para producir células capaces de expresar un anticuerpo de la invención o sus correspondientes cadenas de inmunoglobulina que comprenden células genéticamente manipuladas con el polinucleótido o con el vector de la invención. Las células que se pueden obtener por el procedimiento de la invención pueden usarse, por ejemplo, para comprobar la interacción del anticuerpo de la invención con su antígeno.

[0048] Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de anticuerpos a partir de hibridomas que comprende un nuevo protocolo de purificación como se describe en el ejemplo 2. Aunque pueden usarse protocolos de purificación comunes para obtener anticuerpos de la invención, estos pueden ser menos

- eficaces que el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Históricamente, la proteína A ha sido el procedimiento preferido de purificación de inmunoglobulinas. Sin embargo, existen determinados tipos de anticuerpos, como los anticuerpos de cadena sencilla IgE, IgY e IgM que no pueden purificarse usando la proteína A. Un procedimiento alternativo de purificación de inmunoglobulinas, la cromatografía de adsorción tiofílica, es ideal para estos tipos de aplicaciones, así como la purificación de inmunoglobulinas en general. Para referencias generales relacionadas con los procedimientos de purificación de proteínas que incluyen la purificación de inmunoglobulinas consulte, por ejemplo, el folleto de BD Biosciences Clontech, Pablo Alto, Calif., EE. UU., www.clontech.com. Según procedimientos previos usando agarosa tiofílica, se ha establecido un nuevo protocolo de purificación según la presente invención, que es especialmente adecuado para obtener anticuerpos del tipo IgG1, IgG2a e IgM a partir de hibridomas, especialmente aquellos hibridomas que producen anticuerpos de la presente invención que se describe en este documento. Sin embargo, se entenderá que el nuevo procedimiento para la purificación de anticuerpos es generalmente aplicable. Para los detalles experimentales, véase el ejemplo 2. A este respecto, se describen los procedimientos para obtener anticuerpos que incluyen el protocolo de purificación que se describe en el ejemplo 2, que pueden tener modificaciones menores, por ejemplo, en la composición de los tampones correspondientes, en la que puede tolerarse una desviación de +/-10% de la concentración de los diferentes componentes. Además, la presente invención se refiere a anticuerpos obtenidos mediante el nuevo procedimiento descrito en este documento, así como los fragmentos de unión de dichos anticuerpos. De forma natural, la presente descripción también se extiende a derivados de estos anticuerpos y a fragmentos de unión como los descritos en este documento.
- 20 **[0049]** Como se mencionó anteriormente, la inmunoglobulina y sus ADNc codificantes pueden modificarse adicionalmente. Por tanto, en una realización adicional, el procedimiento de la presente descripción comprende cualquiera de las otras etapas de producción de un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena sencilla, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo marcado y un análogo de cualquiera de ellos. Los procedimientos correspondientes son conocidos por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane «Antibodies, A Laboratory Manual», CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Cuando los derivados de dichos anticuerpos se obtienen mediante técnicas de despliegue de fagos, puede usarse la resonancia de plasmones superficiales como se emplea en el sistema BIAcore para aumentar la eficacia de los anticuerpos en fagos que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en el documento WO8909622. Los procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en los documentos EP-A1 0 239 400 y WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos que pueden utilizarse según la presente invención son los denominados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos como anticuerpos humanos en ratones se describe en, por ejemplo, los documentos WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 y WO96/33735. Como se describe anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en diversas formas además de como anticuerpos completos; lo que incluye, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como en cadenas sencillas; véase, por ejemplo, el documento WO88/09344.
- 40 **[0050]** Los anticuerpos de la presente invención o sus correspondientes cadenas de inmunoglobulinas pueden modificarse adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la materia, por ejemplo, usando deleciones, inserciones, sustituciones, adiciones y/o recombinaciones y/o cualesquiera otra modificación conocida en la materia sola o en combinación. Los procedimientos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN que subyace a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos para el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más de los aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de la cadena lateral, modificaciones de la estructura molecular y modificaciones de los extremos N y C-terminales incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación y la unión de restos de hidratos de carbono o lípidos, cofactores y similares.
- 50 Asimismo, la presente invención abarca la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo amino terminal fusionado a la molécula heteróloga como un ligando inmunoestimulador en el termino carboxilo; véase, por ejemplo, el documento WO00/30680 para obtener los detalles técnicos correspondientes.
- 55 **[0051]** Adicionalmente, en la presente solicitud se describen pequeños polipéptidos que incluyen aquellos que contienen un fragmento de unión a Hsp70 como se describe anteriormente que contiene, por ejemplo, la región CDR3 de la región variable de uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales mencionados. Dichos péptidos pueden sintetizarse o producirse fácilmente por medios recombinantes para producir un agente de unión a Hsp70 útil según la invención. Estos procedimientos son bien conocidos para aquellos expertos en la materia. Los péptidos

pueden sintetizarse, por ejemplo, usando sintetizadores automáticos de péptidos que están disponibles en el mercado. Los péptidos pueden producirse mediante técnicas recombinantes incorporando el ADN que expresa el péptido en un vector de expresión y transformando células con el vector de expresión para producir el péptido. La secuencia de las regiones CDR, para su uso en la síntesis de agentes peptídicos de unión a Hsp70, puede determinarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. La región variable de la cadena pesada es un péptido que generalmente tiene una longitud que oscila de 100 a 150 aminoácidos. La región variable de la cadena ligera es un péptido que generalmente tiene un tamaño que oscila de 80 a 130 aminoácidos. Las secuencias CDR dentro de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera que incluyen solo aproximadamente de 3 a 25 aminoácidos pueden ser secuenciadas fácilmente por un experto en la materia. Los péptidos pueden incluso sintetizarse mediante fuentes comerciales.

[0052] Para determinar si un péptido se une a Hsp70 puede emplearse cualquier ensayo de unión conocido. Por ejemplo, el péptido puede inmovilizarse en una superficie y, a continuación, ponerse en contacto con Hsp70 marcado. La cantidad de Hsp70 que interacciona con el péptido o la cantidad que no se une al péptido puede cuantificarse a continuación para determinar si el péptido se une a Hsp70. Una superficie que tiene los anticuerpos monoclonales anti-Hsp70 mencionados anteriormente inmovilizados en la misma superficie puede servir como control positivo.

[0053] También puede realizarse la selección de agentes de unión a Hsp70 utilizando un ensayo de competición. Si el agente de unión a Hsp70 que está siendo ensayado compete con un anticuerpo monoclonal anti-Hsp70 de la presente invención como muestra una disminución de la unión del anticuerpo monoclonal, entonces es probable que el agente y el anticuerpo monoclonal anti-Hsp70 se unan al mismo epítipo o a uno muy relacionado. Aún otra forma de determinar si un agente tiene la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-Hsp70 descritos anteriormente es incubar previamente el anticuerpo monoclonal con Hsp70 con el que normalmente reacciona (es decir, se une) y, a continuación, añadir el agente que se está probando para determinar si se inhibe la capacidad de unión a Hsp70 de la agente que se está probando. Si se inhibe el agente que se está probando, entonces, con toda probabilidad, este tiene el mismo epítipo, o uno funcionalmente equivalente, y la misma especificidad que los anticuerpos monoclonales anti-Hsp70.

[0054] Usando procedimientos de rutina conocidos por los expertos en la materia, se puede determinar si un agente de unión a Hsp70 es útil según la invención mediante la determinación de si el agente es uno de los que modulan la proliferación o citotoxicidad de las células T en un ensayo *in vitro* como la determinación de la liberación de TNF por las células T o mediante el ensayo de liberación de ⁵¹Cr; véase, por ejemplo, Herin y col., Int. J. Cancer 39 (1987), 390-396. En los ejemplos se describen otros ensayos, así como en otras partes de este documento, véase también el documento WO02/22656.

[0055] Los polipéptidos (p. ej., anticuerpos) y otros agentes de unión a Hsp70 descritos anteriormente también pueden usarse desde un punto de vista inmunoterapéutico para enfermedades en humanos. El término «inmunoterapéuticamente» o «inmunoterapia» como se usa en este documento junto con los agentes de unión a Hsp70, indica tanto administración profiláctica como terapéutica. Por tanto, los péptidos pueden administrarse a sujetos de alto riesgo para reducir la probabilidad y/o intensidad de una enfermedad como un tumor, o una enfermedad infecciosa, o administrarse a sujetos que ya manifiestan dichas enfermedades.

[0056] Los agentes de unión a Hsp70 que aumentan o disminuyen la actividad de las células NK pueden seleccionarse usando los ensayos descritos, por ejemplo, en el documento WO02/22656 y según los ensayos de citotoxicidad y proliferación de células citotóxicas convencionales, como ensayos de reacción de cultivo mixto de linfocitos, ensayos de liberación de cromo, ensayos de liberación de TNF y ensayos de incorporación de timidina. Se considera que un agente de unión a Hsp70 monovalente, por ejemplo, derivados de anticuerpos de cadena sencilla que tienen solo un dominio de unión del anticuerpo original, inhibirá la señal estimuladora de Hsp70 reduciendo los polipéptidos Hsp70 expresados por las células diana.

[0057] Por tanto, la presente invención se refiere a cualquier anticuerpo y moléculas de unión similares como se caracteriza en la reivindicación 1, que preferiblemente tienen sustancialmente las mismas características de unión inmunológica que los anticuerpos monoclonales cmHsp70.1 o cmHsp70.2, es decir, que reconocen el mismo epítipo y, sustancialmente, con la misma afinidad, o al menos 1/10 de la afinidad de los anticuerpos de la invención usado como ejemplo en este documento. La especificidad de unión y la afinidad de dichos anticuerpos y moléculas de unión pueden estudiarse por ejemplo, usando ensayos competitivos con un anticuerpo producido por un hibridoma de la invención. Los anticuerpos de la presente invención encontrarán típicamente su uso a nivel individual en el tratamiento de sustancialmente cualquier enfermedad susceptible de tratamiento a base de anticuerpos

monoclonales. En particular, las inmunoglobulinas pueden usarse como agentes inmunosupresores. Para un anticuerpo de la invención, entre los estados patológicos típicos adecuados para el tratamiento se incluyen síntomas inflamatorios. Los anticuerpos pueden usarse a nivel terapéutico en, por ejemplo, pacientes que sufren una enfermedad relacionada con la respuesta inmune; véase arriba. Este tratamiento puede conseguirse mediante, por ejemplo, la administración de los anticuerpos de la invención.

[0058] Dicha administración puede utilizar anticuerpos o antígenos tanto marcados como sin marcar. Los agentes de marcaje pueden conjugarse directa o indirectamente a los anticuerpos o antígenos de la invención. Un ejemplo de la conjugación indirecta es el uso de un resto espaciador. Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención pueden comprender un dominio adicional, estando dicho dominio unido mediante enlaces covalentes o no covalentes. La unión puede basarse en la fusión genética según los procedimientos conocidos en la técnica y descritos anteriormente, o puede realizarse, por ejemplo, mediante entrecruzamiento químico como se describe, por ejemplo, en el documento WO94/04686. El dominio adicional presente en la proteína de fusión que comprende el anticuerpo de la invención preferiblemente puede estar unido mediante un enlazador flexible, de forma ventajosa un enlazador polipeptídico, en el que dicho enlazador peptídico comprende aminoácidos unidos en un péptido plural e hidrófilo de longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C-terminal de dicho dominio adicional y el extremo N-terminal del anticuerpo de la invención o viceversa. La proteína de fusión descrita anteriormente puede comprender además un enlazador susceptible de escisión o un sitio de escisión para proteinasas. Estos restos espaciadores, a su vez, pueden ser solubles o insolubles (Diener y col., Science 231 (1986), 148) y pueden seleccionarse para que permitan la liberación de fármacos a partir del antígeno en el sitio diana. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden conjugarse con los anticuerpos, antígenos y epítopes de la invención para inmunoterapia se incluyen fármacos, radioisótopos, lectinas y toxinas. Entre los fármacos que pueden conjugarse con los anticuerpos, antígenos y epítopes de la invención se incluyen compuestos que clásicamente se denominan fármacos, como la mitomicina C, la daunorrubicina y la vinblastina. Cuando se usan anticuerpos, antígenos o epítopes de la invención conjugados con radioisótopos para, por ejemplo, inmunoterapia, pueden ser más preferibles unos determinados isótopos que otros dependiendo de factores como la distribución de leucocitos, así como la estabilidad y emisión. Dependiendo de la respuesta autoinmune, pueden preferirse unos emisores con respecto a otros. En general, en inmunoterapia se prefieren radioisótopos que emiten partículas α y β . Se prefieren emisores de corto rango y alta energía como ^{212}Bi . Entre los ejemplos de radioisótopos que pueden unirse a los anticuerpos, antígenos o epítopes de la invención con fines terapéuticos están ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{212}At , ^{211}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd y ^{188}Re . Los expertos en la materia conocen otros agentes terapéuticos que pueden conjugarse al anticuerpo, antígeno o epítopo de la invención, así como protocolos terapéuticos *ex vivo* e *in vivo* o pueden determinarlos fácilmente. Siempre que sea apropiado, el experto en la materia puede usar un polinucleótido de la invención que codifica uno cualquiera de los anticuerpos o antígenos descritos anteriormente o los vectores correspondientes en lugar del propio material proteínico.

[0059] Como se describe anteriormente, el polinucleótido de la invención puede usarse solo o como parte de un vector para expresar el (poli)péptido de la invención en células. En principio esto también permite la terapia génica de enfermedades relacionadas con la expresión inapropiada de Hsp70 en la membrana plasmática. Por ejemplo, es posible introducir un polinucleótido o un vector de la invención en una célula del sistema inmune, preferiblemente una célula citotóxica para permitir que la célula exprese un receptor que comprende el dominio de unión de un anticuerpo de la presente invención, que hace que la célula sea capaz de reconocer específicamente a las células tumorales o a otras células enfermas, que expresan Hsp70 en su superficie celular. Los polinucleótidos o vectores de la invención se introducen en las células que, a su vez, producen el anticuerpo o las moléculas receptoras correspondientes. La terapia génica, que se basa en introducir genes terapéuticos en las células mediante técnicas *ex vivo* o *in vivo* es una de las aplicaciones más importantes de la transferencia de genes. Los vectores y los procedimientos adecuados para la terapia génica *in vitro* o *in vivo* se describen en la literatura y son conocidos para los expertos en la materia; véase, por ejemplo, Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; documentos WO94/29469; WO97/00957 o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640 y las referencias citadas en estos. Los polinucleótidos y vectores de la invención pueden diseñarse para la introducción directa o para la introducción a través de liposomas o vectores virales (p. ej., adenovirus, retrovirus) dentro de la célula. Preferiblemente, dicha célula es una célula de la línea germinal, célula embrionaria u óvulo, o derivada de estas, más preferiblemente, dicha célula es una célula madre.

[0060] La Hsp70 unida a la membrana plasmática interacciona con otras moléculas de la superficie celular por lo que es razonable asumir que los agentes que modulan estas interacciones tendrán efectos beneficiosos, aditivos y preferiblemente sinérgicos sobre el tratamiento de enfermedades y afecciones, en las que cualquiera de estas

proteínas están implicadas. Además, se prevé que estos agentes sean útiles para diagnóstico, donde la presencia o ausencia de alguna de estas proteínas se asocie con dicha enfermedad o afección. Por consiguiente, la presente invención también proporciona moléculas bi o multifuncionales que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo según la invención, una cadena de inmunoglobulina o un fragmento de unión del mismo, que se une a la proteína de choque térmico (Hsp70) unida a la membrana de la superficie celular, y al menos un dominio funcional adicional; véase también arriba. En una realización preferida dicha molécula bi o multifuncional es una molécula biespecífica, siendo especialmente preferido un anticuerpo biespecífico.

[0061] El término «molécula biespecífica» incluye moléculas que tienen al menos los dos dominios de unión mencionados directa o indirectamente unido por medios físicos o químicos. Sin embargo, la molécula biespecífica de la presente invención puede comprender además dominios funcionales, como dominios y/o restos de unión adicionales tales como un agente citotóxico o un marcador y similares; véase también arriba.

[0062] Los medios y procedimientos para la preparación de moléculas multivalentes multiespecíficas que tienen al menos una especificidad para un antígeno deseado son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, en el documento WO9959633 se describen moléculas multiméricas con al menos una especificidad para la cadena invariable (Ii) de HLA de clase II y su uso para el aclaramiento de los agentes terapéuticos o diagnósticos, autoanticuerpos, anticuerpos anti-injerto u otros compuestos no deseados. Según se usa en este documento, siempre que no se indique otra cosa o resulte claro por el contexto, el anticuerpo o sus dominios, regiones y fragmentos de unión se acuerdan según definiciones convencionales, así como en la técnica; véase por ejemplo, Abbas y col., *Cellular and Molecular Immunology* (1991), W. B. Saunders Company, Filadelfia, PA.

[0063] Determinadas moléculas biespecíficas de la presente invención se usan para su unión al antígeno o para bloquear la interacción de una proteína y su ligando; sin embargo, se prefiere su uso para favorecer interacciones entre células inmunes y células diana. Finalmente, las moléculas de unión al antígeno de la invención se usan para localizar células inmunes, células tumorales, células infectadas, fármacos antitumorales, restos diana, moléculas indicadoras o agentes de producción de señal detectable para un antígeno de interés.

[0064] Las moléculas biespecíficas de la invención pueden entrecruzar antígenos en las células diana con antígenos de las células efectoras del sistema inmune. Esto puede ser útil, por ejemplo, para estimular respuestas inmunes dirigidas frente a células que tienen antígenos de interés en particular en la superficie celular. Según la invención, entre las células efectoras del sistema inmune se incluyen células específicas de antígeno como células T que activan respuestas inmunes celulares y células no específicas como macrófagos, neutrófilos y células citolíticas naturales (NK) que median en las respuestas inmunes celulares. Por tanto, las moléculas biespecíficas de la invención pueden tener un sitio de unión adicional para cualquier antígeno de la superficie celular de una célula efectora del sistema inmune. Entre estos antígenos de la superficie celular se incluyen, por ejemplo, receptores de citoquinas y linfoquinas, receptores Fc, CD3, CD16, CD28, CD32, CD64 y CD94. En general, se proporcionan sitios de unión a antígeno mediante scFv que derivan de anticuerpos dirigidos frente a los antígenos mencionados anteriormente y que son bien conocidos en la técnica. Los sitios de unión al antígeno de la invención que son específicos de receptores de citoquinas y linfoquinas también pueden ser secuencias de aminoácidos que se corresponden con todo o parte del ligando natural del receptor. Por ejemplo, cuando el antígeno de la superficie celular es un receptor de IL-2, una proteína de unión a antígeno de la invención puede tener un sitio de unión a antígeno que comprenda una secuencia de aminoácidos que se corresponda con la IL-2. Entre otras citoquinas y linfoquinas se incluyen, por ejemplo, interleuquinas como la interleuquina-4 (IL-4), la interleuquina-5 (IL-5) o la interleuquina-15 (IL-15) y factores estimulantes de colonias (CSF) como CSF de granulocitos macrófagos (GM-CSF) y CSF de granulocitos (G-CSF).

[0065] Además, cualquiera de las moléculas biespecíficas descritas puede contener un dominio de unión a FcγRI en células efectoras activadas. El potencial clínico de esta estrategia para el tratamiento de tumores como neoplasias malignas de células B resulta más atractivo. El desencadenamiento de la inmunidad antitumoral mediante la expresión de scFv anti-FcγRI sobre la superficie de las células cancerosas se ha descrito en Gruel y col., *Gene Ther.* 8 (2001), 1721-1728.

[0066] Además o alternativamente, la molécula biespecífica de la invención puede comprender un dominio de unión a CD3. Esta realización es especialmente útil para el tratamiento de carcinomas; véase, por ejemplo, Riesenber y col., *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001), 911-917, que describe la lisis de células de carcinoma de próstata mediante anticuerpos biespecíficos trifuncionales (alfa EpCAM x alfa CD3).

[0067] Estas y otras combinaciones de dominios funcionales en la molécula biespecífica de la presente invención y

el uso de los mismos están incluidos en la presente invención.

[0068] En una realización preferida, la molécula biespecífica de la presente invención es un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos pueden comprender regiones Fc constantes, por ejemplo, para la asociación de las cadenas polipeptídicas que comprenden los dominios de unión. Además de proporcionar la asociación de las cadenas polipeptídicas, los dominios constantes Fc contribuyen a otras funciones de la inmunoglobulina. Las funciones incluyen activación de la citotoxicidad mediada por complemento, activación de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo o unión al receptor de Fc. Cuando las proteínas de unión a antígeno de la invención se administran con fines terapéuticos o diagnósticos, los dominios constantes Fc también contribuyen a la semivida en el suero. Los dominios constantes Fc puede proceder de cualquier especie de mamífero o ave. Cuando las proteínas de unión a antígeno de la invención se usan para el tratamiento de humanos, se prefieren los dominios constantes de origen humano, aunque los dominios variables pueden no ser de origen humano. En los casos en los que se prefieren los dominios variables humanos, pueden usarse scFv quiméricos. Los medios y procedimientos adicionales para la producción de anticuerpos biespecíficos se describen en la técnica; véase por ejemplo, el documento WO97/14719 en el que se describe un proceso para la producción de fragmentos de anticuerpo de cabeza doble biespecíficos o bivalentes, que están compuestos de un complejo de unión que contiene dos cadenas polipeptídicas, y el documento WO01/80883. Además, la aidez por los antígenos de las moléculas biespecíficas de la invención a la vez que se mantiene su capacidad para funcionar como anticuerpo natural, incluyendo la capacidad para activar la citotoxicidad mediada por complemento y la toxicidad celular dependiente de anticuerpo; véase, por ejemplo, el documento WO01/90192.

[0069] Además, la presente invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo, la molécula bi o multifuncional, el polinucleótido o el vector o célula de la invención anteriormente descrito. La composición de la presente invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0070] Adicionalmente, pueden añadirse restos que mejoren la solubilidad, la semivida, la absorción, etc., de la molécula base. Alternativamente, los restos pueden atenuar efectos adversos no deseados de la molécula base o disminuir la toxicidad de la molécula base. Ejemplos de estos restos se describen en diversos textos, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences.

[0071] Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden estos vehículos pueden formularse por procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse a través de diversas medios, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Las formulaciones en aerosol, como formulación de spray nasal incluyen soluciones acuosas o de otro tipo purificadas del principio activo con agentes conservante y agentes isotónicos. Estas formulaciones se ajustan preferiblemente a un pH y estado isotónico compatible con las membranas de la mucosa nasal. Las formulaciones para la administración rectal o vaginal pueden presentarse como supositorios con un vehículo adecuado.

[0072] El médico responsable determinará la pauta posológica y otros factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, como la estatura del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto en particular que se debe administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 μg (o de un ácido nucleico para su expresión o para inhibición de la expresión en este intervalo); sin embargo, también están previstas las dosis por debajo o por encima de este intervalo de ejemplo, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. En general, la pauta como administración regular de la composición farmacéutica debería estar en el intervalo de unidades de 1 μg a 10 mg al día. Si la pauta es una infusión continua, esta también debería estar en el intervalo de unidades de 1 μg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. El progreso puede controlarse mediante evaluación periódica. Las dosis variarán aunque una dosis preferida para la administración intravenosa de ADN es de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula de ADN. Las composiciones de la invención pueden administrarse a nivel local o sistémico. La administración se realizará generalmente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, el ADN puede también administrarse directamente al sitio diana; por ejemplo, mediante administración biobalística a un sitio diana interno o externo o mediante un catéter a una vía en una arteria. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de solventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo.

Entre los vehículos acuosos se incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólico/acuosas, incluyendo medios salinos y tamponados. Entre los vehículos parenterales se incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer con lactato o aceites fijados. Entre los vehículos intravenosos se incluyen agentes de sustitución de líquidos y nutrientes, agentes de sustitución de electrolitos (como aquellos a base de dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos como, por ejemplo, antrímicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender otros agentes como interleuquinas o interferones dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Además, la composición farmacéutica también puede formularse como una vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la invención comprende una molécula biespecífica descrita anteriormente para inmunización pasiva.

[0073] Las composiciones terapéuticas o diagnósticas de la invención se administran a un individuo en una dosis terapéuticamente eficaz suficiente para tratar o diagnosticar trastornos como se menciona anteriormente. La cantidad eficaz puede variar según diversos factores, tales como estado del individuo, peso, sexo y edad. Entre otros factores se incluye el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse al individuo por varias vías, como vía intracoronaria, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, transdérmica, intrasnovial, intramuscular u oral. Además, puede ser deseable la administración conjunta o secuencial de otros fármacos. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad de molécula activa de la invención suficiente para mejorar los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de estos compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, la DE_{50} (dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL_{50} (dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} .

[0074] La composición farmacéutica de la presente invención además comprende un fármaco inmunoestimulador en una realización preferida. Los fármacos inmunoestimuladores se usan para potenciar una reacción inmune o para inducir una reacción inmune frente a epítopes que no desencadenan una reacción de defensa humoral o citotóxicas en condiciones normales. Estos agentes son bien conocidos en la técnica y pueden elegirse a partir de una amplia variedad de moléculas como moléculas coestimuladoras, por ejemplo, citoquinas y/o adyuvantes.

[0075] Un «adyuvante» se refiere a una sustancia que potencia una respuesta inmune incluyendo, por ejemplo, pero sin limitaciones, propiedades inmunoestimulantes del antígeno o los efectos farmacológicos de un compuesto o fármaco. Un adyuvante puede potenciar inespecíficamente una respuesta inmune, por ejemplo, la respuesta inmune a un antígeno. El «adyuvante completo de Freund» por ejemplo, es una emulsión de aceite y agua que contiene un inmunógeno, un agente emulsionante y micobacterias. Otro ejemplo, el «adyuvante incompleto de Freund» es lo mismo pero sin micobacterias. Un adyuvante puede comprender aceites, emulsionantes, bacterias muertas, hidróxido de aluminio o fosfato de calcio (p. ej., en forma de gel) o combinaciones de los mismos. Un adyuvante puede administrarse a un sujeto (p. ej., mediante inyección intramuscular o subcutánea) en una cantidad suficiente para producir anticuerpos. La comparación del efecto de adyuvantes inmunológicos diferentes sobre el anticuerpo y la respuesta de células T a la inmunización con las vacunas para cáncer MUC1-KLH y GD3-KLH en ratones se han descrito en Kim y col., Vaccine 18 (1999), 597-603. En esta publicación también se describen los ensayos de tipo ELISA para respuestas de anticuerpos IgM e IgG, así como la proliferación y liberación de citoquinas (IFN-gamma e IL-4) para las respuestas de células T, que también pueden realizarse según la presente invención.

[0076] La presente invención también se refiere a una composición diagnóstica que comprende un anticuerpo, una molécula bi o multifuncional, un polinucleótido, un vector o una célula según la invención y, opcionalmente, reactivos utilizados de manera convencional en procedimientos diagnósticos basados en el sistema inmune o en ácidos nucleicos. Para su uso en diagnóstico, hay disponible diversas técnicas para el marcaje de biomoléculas que son bien conocidas por los expertos en la materia. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en Tijssen, «Practice and theory of enzyme immuno assays», Burden, RH y von Knippenburg (Eds), volumen 15 (1985), «Basic methods in molecular biology»; Davis LG, Dimer MD; Battey Elsevier (1990), Mayer y col., (Eds) «Immunochemical methods in cell and molecular biology», Academic Press, London (1987), o en la serie «Methods in Enzymology», Academic Press, Inc. Existen muchos marcadores y procedimientos de marcaje diferentes conocidos para los expertos en la materia. Normalmente, los marcadores usados comprenden, entre otros, fluorocromos (como fluoresceína, rodamina, rojo Texas, etc.), enzimas (como peroxidada de rábano picante, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina), isótopos radioactivos (como ^{32}P o ^{125}I), biotina, digoxigenina, metales coloidales y compuestos químic o bioluminiscentes (como dioxetanos, luminol o acridinios). Los procedimientos de marcaje, como la conjugación covalente de enzimas o grupos biotínico, yodaciones, fosforilaciones, biotinizaciones, cebado aleatorio, desplazamiento de mellas, adición de colas (usando transferasas terminales) son bien conocidos en la técnica. Los

procedimientos de detección comprenden, pero sin limitaciones, autorradiografía, microscopía de fluorescencia, reacciones enzimáticas directas e indirectas, etc. demás, los compuestos descritos anteriormente, etc., puede estar unidos a una fase sólida. Las fases sólidas son conocidas por los expertos en la materia y pueden comprender microesferas de poliestireno, microesferas de látex, microesferas magnéticas, partículas de metales coloidales, chips 5 y superficies de vidrio y/o silicio, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, eritrocitos de animales o fantasmas de eritrocitos, duracitos y las paredes de los pocillos de una bandeja de reacción, tubos de plástico u otros tubos de ensayo. Entre los procedimientos adecuados de inmovilización de moléculas biespecíficas de la invención en fases sólidas se incluyen, pero sin limitaciones, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. La fase sólida puede retener uno o más receptores adicionales que tienen la capacidad de atraer e inmovilizar la región como se 10 define anteriormente. Este receptor puede comprender una sustancia cargada con carga opuesta con respecto al propio reactivo o a una sustancia cargada conjugada con el reactivo de captura, o el receptor puede ser cualquier pareja de unión específica que esté inmovilizada (unida) en la fase sólida y que sea capaz de inmovilizar el reactivo como se define anteriormente. Los ensayos de detección utilizados normalmente pueden comprender procedimientos radioisotópicos o no radioisotópicos. Estos comprenden, entre otros, RIA (ensayo radioisotópico) e 15 IRMA (ensayo inmunológico radioinmunométrico), EIA (ensayo inmunoenzimático), ELISA (ensayo inmunológico ligado a enzima), FIA (ensayo inmunofluorescente) y CLIA (ensayo inmunoluminiscente). Otros procedimientos de detección que se usan en la técnica son aquellos en los que no se utilizan moléculas marcadoras. Un prototipo de estos procedimientos es el ensayo de aglutinación, basado en la propiedad de una molécula determinada para conectar al menos dos partículas. El formato de diagnóstico basado en ácidos nucleicos también es bien conocido por los expertos en la materia e incluye, pero sin limitaciones, hibridación de transferencias de ADN 20 o de ARN, PCR, secuenciación y análisis de RFLP y SSCP.

[0077] La presente invención también se refiere a un kit que comprende un anticuerpo o una molécula biespecífica de la invención. Estos kit son útiles para diversos fines incluyendo, pero sin limitaciones, análisis forenses, 25 aplicaciones diagnósticas y estudios epidemiológicos según las enfermedades y trastornos descritos anteriormente. Dicho kit podría normalmente comprender un soporte compartimentalizado adecuado para mantener en estrecho confinamiento al menos un recipiente. El vehículo además podría comprender reactivos para la detección de dicho antígeno marcado o de los sustratos enzimáticos o similares.

[0078] De forma natural la presente invención también abarca un procedimiento para diagnosticar un tumor que comprende probar las células de una muestra de un paciente con el anticuerpo, o la molécula bi o multifuncional según la invención, donde la presencia o aumento de la cantidad de Hsp70 localizada a nivel extracelular es 30 indicativa del tumor.

[0079] Este procedimiento preferiblemente comprende una etapa inmunológica. Los procedimientos diagnósticos utilizados normalmente que emplean anticuerpos y/o moléculas bi o multifuncionales son, por ejemplo, inmunohistoquímica sobre cortes de tejidos congelados o incluidos en parafina, inmunotransferencias, 35 inmunoprecipitación, etc. Opcionalmente, pueden usarse agentes productores de señales fáciles de detectar junto con dichos anticuerpos o moléculas bi o multifuncionales.

[0080] Los agentes productores de señales detectables son útiles *in vivo* e *in vitro* con fines diagnósticos. El agente productor de señales produce una señal cuantificable que se detecta por medios externos, normalmente la medición de radiación electromagnética. La mayoría de las veces, el agente productor de señales es una enzima o cromóforo, o emite luz mediante fluorescencia, fosforescencia o quimioluminiscencia. Entre los cromóforos se 40 incluyen colorantes que absorben la luz en el intervalo de longitud de onda del ultravioleta o del visible, y pueden ser sustratos o productos de degradación de reacciones catalizadas por enzimas.

[0081] Como se describe anteriormente, las composiciones de la presente invención son útiles en diagnóstico, profilaxis, vacunación o terapia. Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, la molécula 50 bi o multifuncional, la molécula de ácido nucleico o la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor o la modulación de una respuesta inmune.

[0082] Para estas realizaciones, los anticuerpos o las moléculas bi o multifuncionales de la invención pueden unirse química o biosintéticamente a los agentes antitumorales o a los agentes productores de señales detectables; 55 véase también *supra*. Entre los agentes antitumorales ligados a una molécula biespecífica, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, se incluye cualquier agente que destruye o daña un tumor al cual está unido el anticuerpo o en el entorno de la células al cual se ha unido el anticuerpo. Por ejemplo, un agente antitumoral es un agente tóxico como un agente quimioterapéutico o un radioisótopo. Los expertos en la materia conocen agentes quimioterapéuticos adecuados entre los que se incluyen antraciclinas (p. ej., daunomicina y doxorubicina),

metotrexato, vindesina, neocarzinostatina, cis-platino, clorambucilo, arabinósido de citosina, 5-fluorouridina, melfalán, ricina y caliqueamicina. Los agentes quimioterapéuticos se conjugan con el anticuerpo usando procedimientos convencionales; véase, por ejemplo, Hermentin y Seiler, Behring Inst. Mitt. 82 (1988), 197-215. Un procedimiento de tratamiento de un tumor o de modulación de la respuesta inmune en un sujeto que lo necesita, normalmente comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de la molécula bi o multifuncional. Como se mencionó anteriormente, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad de molécula activa de la invención suficiente para mejorar los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de estos compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos en cultivos celulares o animales experimentales, véase también arriba.

10 Para los fines de esta invención, dicha composición farmacéutica se diseña preferiblemente para su administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o como aerosol.

[0083] Preferiblemente, el tumor que se va a tratar o diagnosticar se selecciona a partir del grupo compuesto por carcinomas de pulmón, colorrectal, páncreas, laringe, estómago, cabeza, cuello, mama, ovarios, útero, cuello uterino, hígado, sistema nervioso central y periférico, sarcomas, leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfática aguda (LLA), linfoma no Hodgkin (LNH), síndrome mieloproliferativo (SMP), síndrome mielodisplásico (SMD), plasmocitoma, melanoma y células metastásicas en general.

[0084] También están dentro del alcance de los usos y procedimientos de la presente invención los trastornos relacionados con una respuesta inmune que incluyen, pero sin limitaciones, infecciones virales, infecciones bacterianas, artritis reumatoide, lupus eritematoso, asma bronquial, etc.

[0085] Los términos «tratamiento», «tratando» y similares se usan en este documento generalmente con el significado de obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una curación parcial o completa de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. El término «tratamiento» según se usa en este documento abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, especialmente un humano, e incluye: a) prevenir la aparición de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se haya diagnosticado que la tiene; b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la misma.

[0086] Además, el término «sujeto» según se emplea en este documento se refiere a animales que necesitan mejora, tratamiento y/o prevención de una enfermedad neoplásica o infecciosa. Más preferiblemente dicho sujeto es un humano.

[0087] Debido a la expresión exclusiva de Hsp70 sobre la superficie de las células relacionadas con la enfermedad, la invención proporciona los medios de administración dirigida a estas células, mientras que se impide a las células normales. Esto es especialmente una ventaja si los restos tóxicos están unidos a una molécula terapéutica como se describe anteriormente. Este procedimiento de dirigir un agente terapéutico y/o diagnóstico hacia una célula que expresa un epítipo de Hsp70 localizado extracelularmente sobre la superficie celular comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula bi o multifuncional de la invención. El uso de una molécula bi o multifuncional para dirigir un agente terapéutico y/o diagnóstico a una célula que expresa un epítipo de Hsp70 localizado extracelularmente sobre la superficie celular es, por supuesto, una realización preferida de esta invención. Dicha célula diana puede ser preferiblemente una célula tumoral o una célula relacionada con una enfermedad inmune o una enfermedad infecciosa.

[0088] A partir de lo mencionado, es evidente que la presente descripción abarca cualquier uso de una molécula de unión al ligando que comprende al menos un CDR del anticuerpo anteriormente descrito, en particular para el diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad relacionada con la expresión o disfunción de Hsp70 en la superficie celular de las células diana, en especial de células tumorales o células infecciosas. Preferiblemente, dicha molécula de unión al ligando es un anticuerpo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo. Además, la presente invención se refiere a anticuerpos antiidiotipo de cualquiera de los anticuerpos monoclonales mencionados descritos anteriormente en este documento. Estos son anticuerpos u otras moléculas de unión que se unen a la secuencia peptídica antigénica exclusiva localizada en una región variable del anticuerpo próximo al sitio de unión al antígeno. Un concepto para la inmunoterapia del cáncer implica la inducción de anticuerpos que mimetizan el antígeno para desencadenar en el sistema inmune una respuesta frente a las células tumorales. Anticuerpos antiidiotipo (Ac2) dirigidos frente al sitio de combinación con el antígeno de otros anticuerpos (Ac1) pueden funcionar e, incluso estructuralmente, mimetizar al antígeno e inducir una respuesta inmune anti-anti-idiotipo. Un ejemplo de mimetismo funcional de un anticuerpo anti-idiotipo con respecto a una inmunoglobulina monoclonal

- murina (Ac1), que define el antígeno de cáncer de ovario CA125, se describe en Ma y col., Jpn. J. Cancer Res. 93 (2002), 78-84. Un anticuerpo monoclonal murino anti-idiotipo como sustituto de antígeno para Her-2/neu humano se describe en Baral y col., Int. J. Cancer 92 (2001), 88-95. Otros ejemplos que comprenden inmunoterapia activa con anticuerpo anti-idiotipo para pacientes con carcinoma nasofaríngeo (CNF) se describen en Li y col., Cancer Biother. 5 Radiopharm. 17 (2002), 673-679 y anticuerpos anti-idiotipo portadores de la «imagen interna» del péptido YIGSR que inhibe metástasis espontáneas del carcinoma de pulmón y Lewis en ratones descrito por Koliakos y col. en In Vivo 16 (2002), 511-518. Preferiblemente, el anticuerpo anti-idiotipo está humanizado, véase también arriba.

[0089] La actividad biológica de los anticuerpos identificados aquí sugiere que tienen suficiente afinidad como para que sean posibles candidatos para la localización de fármacos hacia células que expresan las estructuras de superficie apropiadas. Esta dirección y unión a las células podría ser útil para la administración de agentes terapéutica o diagnósticamente activos (incluyendo fármacos dirigidos, secuencias de ADN, secuencias de ARN, lípidos, proteínas [p. ej., factores de crecimiento humanos] y terapia génica/de administración de genes. Las moléculas/partículas con un anticuerpo de la invención podrían unirse específicamente a células/tejidos que expresen Hsp70 sobre la superficie celular y, por tanto, podrían tener uso diagnóstico y terapéutico. De este modo, el anticuerpo o el antígeno de la presente invención puede estar marcado (p. ej., fluorescente, radiactivo, enzima, magnético nuclear) y utilizarse para detectar dianas específicas *in vivo* o *in vitro*, incluyendo ensayos similares a «inmunoquímica» *in vitro*. *In vivo* pueden usarse de forma similar a las técnicas de adquisición de imágenes de medicina nuclear para detectar tejidos, células u otro material que exprese Hsp70, en especial sobre la superficie celular de las células. Otro procedimiento implica administrar un agente terapéuticamente activo a un paciente. El procedimiento incluye administrar al menos un anticuerpo o en fragmento de unión a antígeno y el agente terapéuticamente activo a un paciente. Preferiblemente, el agente terapéuticamente activo se selecciona a partir de fármacos, secuencias de ADN, secuencias de ARN, proteínas, lípidos y combinaciones de los mismos. Más preferiblemente, el agente terapéuticamente activo es un agente antibacteriano, un agente antiinflamatorio y un agente antineoplásico.

[0090] El agente terapéutica o diagnósticamente activo puede estar unido al anticuerpo de la invención o a un fragmento de unión a antígeno del mismo mediante diversos medios. Esto incluye, por ejemplo, proteínas de fusión de cadena sencilla que comprenden las regiones variables del anticuerpo de la invención conjugado mediante procedimientos covalentes, como enlaces peptídicos, al agente terapéutica o diagnósticamente activo. Entre los ejemplos adicionales se incluyen moléculas que comprenden al menos un fragmento de unión a antígeno conjugado covalente o no covalentemente a moléculas adicionales incluyendo aquellas de la siguiente lista ilustrativa no limitante. Traunecker, Int. J. Cancer Surp. SuDP 7 (1992), 51-52, describe el reactivo biespecífico janusina en el que la región Fv dirigido frente a CD3 se conjuga con CD4 soluble u otros ligandos como OVCA e IL-7. De forma similar, las regiones variables del anticuerpo de la invención puede conformarse como moléculas Fv y conjugarse a ligando alternativos como los que se muestran en el artículo citado. Higgins, J. Infect Disease 166 (1992), 198-202, describe un anticuerpo heteroconjugado compuesto por OKT3 entrecruzado con un anticuerpo dirigido frente a una secuencia específica en la región V3 del GP120. Dichos anticuerpos heteroconjugados también se pueden construir usando al menos las regiones variables que contiene el anticuerpo de los procedimientos de la invención. Entre los ejemplos adicionales de anticuerpos específicos se incluyen los descritos por Fanger, Cancer Treat. Res. 68 (1993), 181-194 y Franger, Crit. Rev. Immunol. 12 (1992), 101-124. Entre los conjugados que son inmunotoxinas se incluyen anticuerpos convencionales que se han descrito ampliamente en la técnica. Las toxinas pueden conjugarse con los anticuerpos mediante técnicas de conjugación convencionales o pueden producirse inmunotoxinas que contienen porciones tóxicas de la proteína como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse de la forma correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Entre los ejemplos de estas inmunotoxinas se incluyen las descritas por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 y por Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

[0091] La invención además contempla la unión de las moléculas de la invención a restos diana o indicadores. Los restos diana son los primeros miembros de los pares de unión. Los agentes antitumorales, por ejemplo, se conjugan con los segundos miembros de dichos pares y se dirigen de este modo al sitio al cual se une la proteína de unión a antígeno. Un ejemplo común de estos pares de unión es la avidina y la biotina. La biotina puede conjugarse a una molécula de la invención y, por tanto, proporciona una diana para un agente antitumoral u otro resto que esté conjugado con la avidina o la estreptavidina. Alternativamente, la biotina u otro de estos restos se unen a la molécula de la invención y se usa como indicador, por ejemplo, en un sistema de diagnóstico donde un agente de producción de señal detectable está conjugado con la avidina o la estreptavidina. Los radioisótopos adecuados para su uso como agentes antitumorales también son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo se usa ¹³¹I o ²¹¹At. Estos isótopos se unen al anticuerpo usando técnicas convencionales; véase, p. ej., Pedley y col., Br. J. Cancer 68 (1993), 69-73. Alternativamente, el agente antitumoral que se une al anticuerpo es una enzima que activa un

profármaco. De esta forma, se administra un profármaco que permanece en su forma inactiva hasta que alcanza el lugar del tumor donde se convierte en su forma citotóxica una vez que se administra el complejo del anticuerpo. En la práctica, el conjugado anticuerpo-enzima se administra al paciente y permite localizarlo en la región del tejido que se va a tratar. A continuación el fármaco se administra al paciente de modo que dicha conversión en el fármaco

5

citotóxico se produce en la región del tejido que se va a tratar. Alternativamente, el agente antitumoral conjugado al anticuerpo es una citoquina como interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-15 (IL-15) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El anticuerpo dirige la citoquina al tumor de modo que la citoquina media en el daño o destrucción del tumor sin afectar a otros tejidos. La citoquina se fusiona con el anticuerpo a nivel del ADN usando técnicas de recombinación de ADN convencionales.

10

[0092] Mediante una realización adicional como se menciona anteriormente, pueden usarse moléculas que se unen al ligando y anticuerpos de la invención en un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con Hsp70 en un individuo obteniendo una muestra de líquido corporal y poniendo en contacto la muestra de líquido corporal con un anticuerpo de la invención en condiciones que permitan la formación de

15

complejos antígeno-anticuerpo. De forma similar, pueden obtenerse biopsias u otras muestras de forma habitual en el diagnóstico tumoral. El nivel de estos complejos se determina a continuación mediante procedimientos conocidos en la técnica, indicando un nivel significativamente mayor que el formado en una muestra control la presencia de enfermedad en el individuo estudiado. De la misma forma, también puede usarse el antígeno específico al que se unen los anticuerpos de la invención. Por tanto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que

20

[0093] Estas y otras realizaciones están descritas y las abarcan la descripción y los ejemplos de la presente invención. Bibliografía adicional correspondiente con cualquiera de los materiales, procedimientos, usos y compuestos que se tienen que emplear según la presente invención pueden obtenerse de bibliotecas y bases de

25

datos públicas, usando por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública «Medline» que está hospedada por el National Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine de los National Institutes of Health. Otras bases de datos y direcciones web, como las del European Bioinformatics Institute (EBI), que es parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) son conocidas por los expertos en la materia y también puede obtenerse usando motores de búsqueda en Internet. Una visión general de

30

la información de patentes en biotecnología y un estudio de las fuentes relevantes de información de patentes útil para la búsqueda retrospectiva y el conocimiento actual se proporciona en Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

[0094] La descripción anterior describe en general la presente invención. Puede obtenerse un entendimiento más completo en referencia a los siguientes ejemplos específicos.

35

EJEMPLOS

[0095] Los ejemplos que aparecen a continuación ilustran adicionalmente la invención. Las descripciones detalladas de los procedimientos convencionales, como los que se emplean en este documento pueden encontrarse

40

en la bibliografía citada; véase también «The Merck Manual of Diagnosis and Therapy», Decimoséptima Ed. editado por Beers and Berkow (Merck & Co., Inc. 2003).

[0096] En la práctica de la presente invención se emplearán, siempre que no se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la materia. Medios y procedimientos especialmente útiles para la producción recombinante de moléculas biespecíficas se describen en los documentos

45

WO94/13804, WO01/80883 y WO01/90192.

[0097] Los procedimientos de genética molecular e ingeniería genética se describen generalmente en las ediciones actuales de Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Sambrook y col., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press); DNA Cloning, volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames y Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney y Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller y Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short

50

Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición (Ausubel y col., eds.) y Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller y Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu y col., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London,

55

1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986). Los reactivos, vectores de clonación y kits para manipulación genética referidos en esta descripción están disponibles en proveedores comerciales como BioRad, Stratagene, Invitrogen y Clontech. Las técnicas generales en cultivo celular y recogida de medios se especifican en Large Scales Mammalian Cell Culture (Hu y col., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375) y Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch y col., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA arrays, Herzog y col., CHAOS 11, (2001), 98-107.

Ejemplo 1: Obtención de hibridomas que expresan cmHsp70.1 y cmHsp70.2

10 [0098] Los ratones fueron inmunizados con el péptido TKDNNLLGRFELSG (SEC ID N.º 2) y reinmunizados según un protocolo mejorado por los inventores. Después de establecer varias líneas celulares productoras de anticuerpos que pudo determinarse que reconocían Hsp70, pudieron identificarse dos hibridomas que producen anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de Hsp70 que está localizado a nivel extracelular en las células tumorales.
15 Especialmente, se proporcionan cmHsp70.1, tal y como lo produce el hibridoma cmHsp70.1, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 14 de noviembre de 2003, y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2629, y cmHsp70.2, tal y como lo produce el hibridoma cmHsp70.2, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) el 14 de noviembre de 2003 y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2630.
20 Se determinó que el anticuerpo anti-Hsp70 producido por el hibridoma cmHsp70.1 era una inmunoglobulina de tipo IgG, mientras que el anticuerpo anti-Hsp70 producido por el hibridoma cmHsp70.2 era una inmunoglobulina de tipo IgM.

Ejemplo 2: Purificación de anticuerpos cmHsp70.1 y cmHsp70.2 mediante cromatografía tiofílica

25 [0099] Puesto que los protocolos previos para la purificación de inmunoglobulinas han resultado ser engorrosos para la purificación de anticuerpos anti-Hsp70, se estableció un nuevo protocolo de purificación, que comprendía cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) y los siguientes materiales y procedimientos.

Material

Material de la columna:	T-Gel™ Adsorbent (Pierce, número de producto: 20500)
Volumen:	10 ml
Capacidad de unión:	20 mg de inmunoglobulinas/ml de gel
Diámetro de las microesferas	45-165 µm (agarosa en microesferas al 6 %)

30 Sistema de FPLC Äkta Prime (Amersham Biosciences)

[0100] Los sobrenadantes se obtuvieron de aproximadamente 1000 ml de sobrenadante de hibridoma de los clones cmHsp70.1 o cmHsp70.2 cultivados en medio RPMI1640/STF al 10 % o DEMEM/STF al 20 %, respectivamente. Los sobrenadantes de incubaciones de 48 horas a una densidad celular inicial de $0,2 \times 10^6$ células/ml se recogieron y centrifugaron a $300 \times g$ (5 min, 4°C) seguido de centrifugación a $1000 \times g$ (5 min, 4°C). Los sobrenadantes se conservaron a 4°C.

40 [0101] Los reactivos químicos se obtuvieron de Sigma (Na_3PO_4 ; NaN_3) o Roth ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Tris), todos los tampones se prepararon con agua Millipore.

Tampones

Tampón de unión:	sulfato amónico 0,5 M, fosfato sódico 50 mM y azida sódica al 0,05 %, pH 8,0 16,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,78 g de Na_3PO_4 125 mg de NaN_3 pH 8,0, hasta 250 ml
Tampón de elución:	fosfato sódico 50 mM y azida sódica al 0,05 %, pH 8,0 1,78 g de Na_3PO_4 125 mg de NaN_3 pH 8,0, hasta 250 ml
Tampón de conservación:	Tris 0,5 M y azida sódica al 0,02 %, pH 7,4 15,1 g de Tris 50 mg de NaN_3

pH 7,4, hasta 250 ml

Preparación de la muestra

5 **[0102]** Mientras se mezclaba, se añadieron 66 mg de sulfato amónico por ml de sobrenadante de hibridoma aclarado; véase arriba. La concentración final era de sulfato amónico 0,5 M en la muestra. El sobrenadante del hibridoma se agitó suavemente para evitar la desnaturalización de las inmunoglobulinas por la alta concentración local de sales o el aire. Cuando el sulfato amónico se disolvió por completo, la mezcla se ajustó a pH 8,0 y se centrifugó a 1000 x g. El sobrenadante se eliminó con cuidado y se pasó a través de un filtro de cultivo celular de 0,8 µm (Nalgene, número de producto: 126-0020).

10

Equilibrado de la columna:

15 **[0103]** El sistema de FPLC Äkta Prime se usó en una cámara fría (6°C). El sistema de conexiones se conectó con los matraces de tampón y el sobrenadante del hibridoma. Las conexiones se lavaron exhaustivamente con los respectivos tampones (50 ml mínimo, con un caudal de 50 ml/min) usando los protocolos de lavado automático del sistema FPLC Äkta Prime. Las conexiones se conectaron con la columna T-Gel intentando evitar al tiempo que entraran burbujas de aire en la columna. El T-gel se lavó con tampón de unión (mínimo de 50 ml) con un caudal de 1 ml/min. Se registró la absorbancia a 280 nm y la conductividad durante la etapa de lavado. La columna estaba lista para su uso cuando la absorbancia alcanzaba un valor estable mínimo durante más de 10 min y la conductividad era de aproximadamente 140 mSi/cm.

20

Aplicación de la muestra

25 **[0104]** Se cambió de tampón de unión a sobrenadante del hibridoma con la válvula del tampón del sistema de FPLC Äkta Prime. La muestra se aplicó a la columna a un caudal de 0,5 ml/min y se recogió el flujo a través de la misma. La absorbancia se elevó a aproximadamente 0,2 a 0,6, lo que indicaba la absorbancia de las proteínas no unidas. Por el contrario, la conductividad no debía variar durante la aplicación de la muestra. El sobrenadante se pasó a través de la columna durante la noche. Se cambió de tampón de unión a sobrenadante del hibridoma con la válvula del tampón del sistema de FPLC Äkta Prime. La columna se lavó con tampón de unión (mínimo 50 ml) a un caudal de 0,5 ml/min. La columna se lavó cuando la absorbancia alcanzó un valor estable mínimo durante más de 10 min y la conductividad era de aproximadamente 140 mSi/cm.

30

Elución de las inmunoglobulinas unidas

35 **[0105]** Se cambió de tampón de unión a tampón de elución con la válvula del tampón del sistema de FPLC Äkta Prime. Se encendió el colector automático de muestras y se recogieron fracciones de 4 ml. La proteínas unidas se eluyeron con un caudal de 0,5 ml/min. La absorbancia y la conductividad se registraron, esta última bajó hasta aproximadamente 12 mSi/cm. De forma concomitante, la absorbancia alcanzó un pico, lo que indicaba el paso de las inmunoglobulinas eluidas. Se lavó con tampón hasta que la absorbancia alcanzó un mínimo durante más de 10 min.

40

Conservación de la columna T-Gel

45 **[0106]** Se cambió de tampón de elución a tampón de conservación con la válvula del tampón del sistema de FPLC Äkta Prime. La columna se lavó con un mínimo de 50 ml a un caudal de 2 ml/min. La columna se desconectó, selló y conservó en una cámara fría.

50

[0107] En cada fracción de las proteínas eluidas se comprobó la presencia de inmunoglobulinas con un ELISA específico para inmunoglobulinas. Las fracciones que contenían inmunoglobulinas se agruparon y se concentraron/dializaron frente a PBS mediante unidades de centrifugación/filtración centriprep YM-30 (Amicon, número de producto: 4306) a 1000 x g, 4°C. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo de Bradford convencional.

55

[0108] La especificidad de los anticuerpos cmHsp70.1 o cmHsp70.2 purificados se analizaron mediante:

- A) Análisis por FACS usando células con membrana positiva (Colo+, CX+) o negativa (Colo-/CX-) para Hsp70.
B) Inmunotransferencia usando 10 µg de lisado celular completo (K562) separado mediante PAGE en presencia de SDS al 10%.

- C) Bloqueo de la muerte mediada por NK de las células diana tumorales con membrana positiva para Hsp70 (Colo+, CX+) y/o
 D) Inmunohistoquímica con células tumorales con membrana positiva para Hsp70; véase también el ejemplo 3.

5

[0109] Para obtener más detalles sobre uno o más de las respectivas etapas del procedimiento de purificación de la presente invención, véase Belew y col., J. Immunol. Meth. 102 (1987), 173-182 y Nopper y col., Anal. Biochem. 180 (1989), 66-71, en el que se refieren los procedimientos previos para la purificación de anticuerpos monoclonales usando adsorción estimulada por sales y cromatografía sobre un adsorbente tiófilo y absorbente tiófilo para la cromatografía líquida de alta resolución en una etapa, respectivamente.

Ejemplo 3: Caracterización de las propiedades de unión y de la actividad biológica de los anticuerpos cmHsp70.1 y cmHsp70.2

15 **[0110]** Se ha encontrado que los anticuerpos cmHsp70.1 y cmHsp70.2 inhiben la actividad citolítica de las células frente a células tumorales que expresan Hsp70 usando los procedimientos descritos en Multhoff y col., Int. J. Cancer 61 (1995b), 272 y en el documento WO02/22656; véase también la figura 1. Debido al hecho de que cmHsp70.1 y cmHsp70.2 muestran un efecto inhibitor sobre la actividad citolítica de las células NK contra las células tumorales que expresan Hsp70 resultó interesante mapear los epítopes de unión. Mediante el análisis de péptidos (pepscan)
 20 del dominio de unión del sustrato C-terminal dentro de los restos de aminoácidos 384-618, pudo determinarse que el péptido 8-mer NLLGRFEL (aa 454-461) era la estructura de reconocimiento relevante para el anticuerpo cmHsp70.1. Este anticuerpo reacciona de forma específica con Hsp70 pero no presenta sustancialmente reacción cruzada con Hsc70 según se determinó con los ensayos convencionales. La única diferencia de aminoácidos entre Hsp70 y Hsc70 dentro del epítopo de unión al anticuerpo 8 mer (aa 454-460) es el intercambio en la posición 458 de arginina
 25 (R) por lisina (K). De forma similar, se determinó que el anticuerpo cmHsp70.2 reconocía específicamente un péptido que consistía en la secuencia de aminoácidos TKDNNLLGRFELSG.

[0111] La provisión de lo descrito anteriormente y los hibridomas depositados proporcionan una fuente fiable de anticuerpos anti-Hsp70 capaces de detectar epítopes extracelulares de Hps70 en células viables, preferiblemente
 30 células tumorales permitiendo, por tanto, la detección específica y el tratamiento de las células que muestran Hsp70 en su superficie celular, en particular, células tumorales y células infectadas por patógenos. Por tanto, la presente invención proporciona una nueva clase de anticuerpos anti-Hsp70 para su uso en terapia y diagnóstico, así como en investigación en general.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

[0112]

<110>	multimmune GmbH
40 <120>	Anticuerpos anti-Hsp70 terapéuticos y diagnósticos
<130>	MU03A03/P-EPD1/WO
<140>	PCT/EP2004/013854
<141>	12-06-2014
<150>	EP03028144.8
45 <151>	12-05-2003
<160>	2
<170>	PatentIn versión 3.3
<210>	1
50 <211>	8
<212>	PROT
<213>	<i>Homo sapiens</i>
<220>	
55 <221>	PÉPTIDO
<222>	(1) .. (8)
<223>	Epítopo del anticuerpo monoclonal cmHsp70.1
<400>	1

Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu
1 5

<210> 2
5 <211> 14
<212> PROT
<213> *Homo sapiens*

<220>
10 <221> PÉPTIDO
<222> (1) .. (14)
<223> Epítoto del anticuerpo monoclonal cmHsp70.2

<400> 2
15

Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 1, Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que
- 5 i) se une a un epítoto localizado extracelularmente de la Hsp70 unida a membrana sobre las células tumorales, en el que dicho epítoto comprende o consta de la secuencia de aminoácidos NLLGRFEL (SEC ID N.º: 1) o TKDNNLLGRFELSG (SEC ID N.º: 2); y
- 10 ii) comprende las CDR determinadas según Kabat del anticuerpo monoclonal cmHsp70.1 tal y como lo producía el hibridoma cmHsp70.1, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 14 de noviembre de 2003, y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2629, o cmHsp70.2, tal y como lo produce el hibridoma cmHsp70.2, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) el 14 de noviembre de 2003 y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2630.
- 15 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, que es el anticuerpo monoclonal cmHsp70.1 tal y como lo producía el hibridoma cmHsp70.1, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 14 de noviembre de 2003, y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2629, o cmHsp70.2, tal y como lo produce el hibridoma cmHsp70.2, depositado en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) el 14 de noviembre de 2003 y al que se asignó el número de acceso de la DSM ACC2630.
- 20 4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es capaz de mostrar un efecto inhibitor sobre la actividad citolítica de las células NK contra las células tumorales que expresan Hsp70.
- 25 5. Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 6. Un polinucleótido que codifica la región variable de ambas cadenas de la inmunoglobulina del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35 7. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 6.
8. Una célula huésped que comprende un polinucleótido de la reivindicación 6 o un vector de la reivindicación 7.
9. Una molécula bi o multifuncional que comprende el dominio de unión de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y al menos un dominio funcional adicional.
- 40 10. La molécula bi o multifuncional de la reivindicación 9, en la que dicho dominio funcional adicional es un agente citotóxico o un marcador.
- 45 11. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la molécula bi o multifuncional de la reivindicación 9 o 10, el polinucleótido de la reivindicación 6, el vector de la reivindicación 7 o la célula de la reivindicación 8.
- 50 12. La composición de la reivindicación 11, en la que dicha composición es
- a) una composición farmacéutica y además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable o
- b) una composición diagnóstica y, opcionalmente, además comprende reactivos convencionalmente usados en procedimientos diagnósticos basados en el sistema inmune o en ácidos nucleicos.
- 55 13. Un procedimiento de determinación de un tumor que comprende células de ensayo en una muestra de un paciente con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la molécula bi o multifuncional de la reivindicación 9 o 10, en el que la presencia o aumento de la cantidad de Hsp70 localizado a nivel extracelular es indicativo de tumor.

14. Una molécula bi o multifuncional de la reivindicación 9 o 10 para su uso *in vivo* para diagnosticar una célula que expresa un epítotope localizado a nivel extracelular de Hsp70 en la superficie celular, en la que dicha célula es una célula tumoral o una célula relacionada con una enfermedad inmune o infecciosa.

5

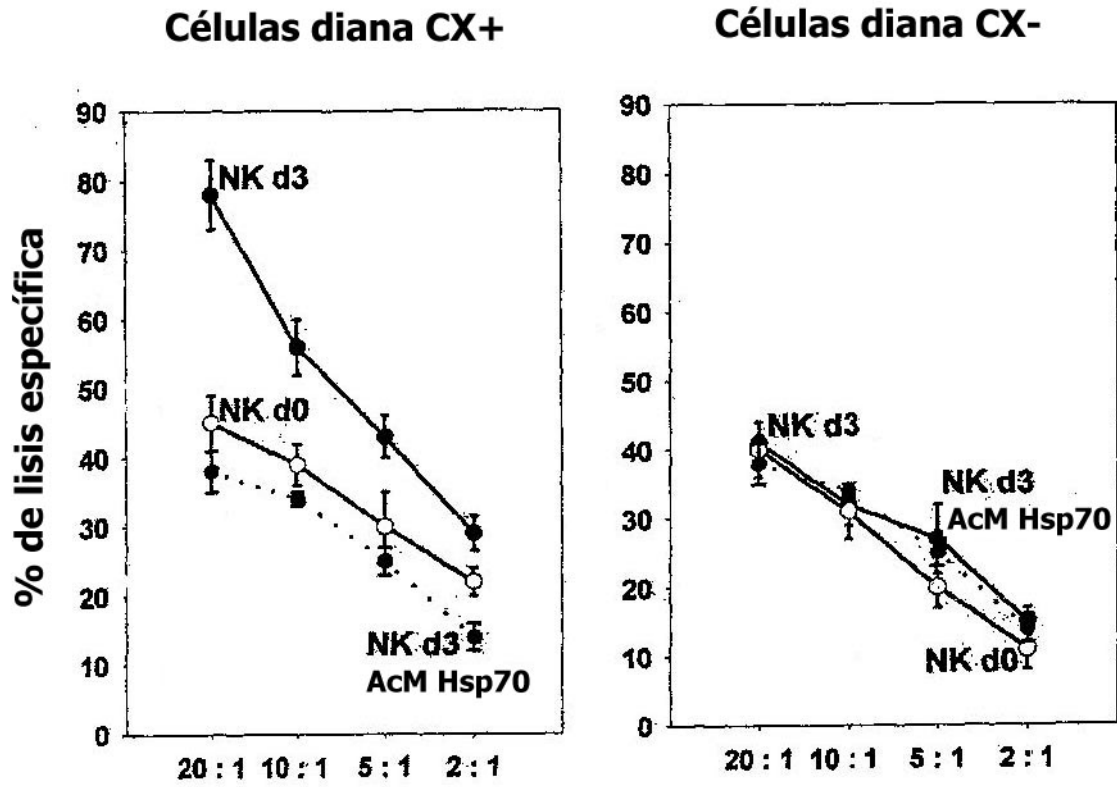


Fig. 1