

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para el diagnóstico y el tratamiento de cánceres derivados de células epiteliales

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al uso de un polipéptido (CD27L) para el diagnóstico de cánceres relacionados con células epiteliales, en particular cáncer de riñón, por ejemplo, cáncer de células renales y cáncer colorrectal, por ejemplo, cánceres de colon, así como a procedimientos para el tratamiento de dichos cánceres.

15 El tratamiento de la mayoría de los tipos de cáncer normalmente es mediante cirugía, quimioterapia, radioterapia o terapia biológica. Sin embargo, algunos tumores se vuelven refractarios a dichos tratamientos, cuando las células cancerosas desarrollan resistencia a los fármacos de la quimioterapia o pierden su sensibilidad hormonal, conduciendo a la enfermedad recurrente o metastática, que a menudo es incurable. Más recientemente, la atención se ha centrado en el desarrollo de terapias inmunológicas (Green y col. (2000) *Cancer Treat. Rev.* 26, 269 – 286; Davis (2000) *Immunol. Cell Biol.* 78, 179 – 195; Knuth y col. (2000) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46, S46 – 51; Shiku y col. (2000) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46, S77 – 82; Saffran y col. (1999) *Cancer Metastasis Rev.* 18, 437 – 449), tales como vacunas y anticuerpos monoclonales (mAb) contra el cáncer, como un medio para iniciar y dirigir una respuesta inmunitaria del huésped contra las células tumorales. En 1998, la FDA aprobó el uso de la herceptina (Stebbing y col. (2000) *Cancer Treat. Rev.* 26, 287 – 290; Dillman (1999) *Cancer Biother. Radiopharm.* 14, 5 – 10; Miller y col. (1999) *Invest. New Drugs* 17, 417 – 427), un mAb que reconoce la proteína receptora erbB2/HER2-neu, como tratamiento para el cáncer de mama metastático. En combinación con la quimioterapia, la herceptina ha mostrado prolongar el tiempo para el avance de la enfermedad, cuando se compara con pacientes que reciben solo quimioterapia (Baselga y col. (1998) *Cancer Res.* 58, 2825 – 2831). La identificación de otros objetivos adecuados o antígenos para la inmunoterapia de otros cánceres, por ejemplo los cánceres derivados de células epiteliales, ha ido teniendo una importancia creciente.

30 Cáncer de riñón

Hay tres tipos principales de cáncer de riñón, el cáncer de células renales que se desarrolla en el revestimiento de los túbulos renales que filtran la sangre, el tumor de Wilm, que se encuentra principalmente en niños menores de 5 años, y el cáncer de células de transición de la pelvis renal y/o uréter, que se desarrolla en el revestimiento de la vejiga, uréteres o pelvis renal. Dan cuenta, respectivamente, de aproximadamente 80 %, 5 % y 7 % de todos los casos de enfermedades renales.

40 Cuando el cáncer de riñón crece, puede invadir órganos cercanos al riñón, tales como el hígado, colon o páncreas. Cuando el cáncer de riñón se extiende, las células cancerosas pueden aparecer en los nódulos linfáticos. Por esta razón, se pueden extirpar durante la cirugía los nódulos linfáticos cercanos al riñón. El cáncer de riñón se puede extender y formar cánceres nuevos, con más frecuencia en los huesos y pulmones.

45 La cirugía es el principal tratamiento para el cáncer de riñón. El objetivo de la cirugía es extirpar todo o tanto del cáncer como sea posible y establecer el estadio del cáncer con precisión de modo que se pueda evaluar la necesidad para cualquier tratamiento adicional. En la nefrectomía radical, se extirpa el riñón entero junto con el cáncer. La glándula suprarrenal, que está unida al riñón, también se extirpa, junto con el tejido graso que rodea el riñón. También se extirpan los nódulos linfáticos cercanos, ya que esto ayuda a los médicos a decidir en qué estadio está el cáncer. En una nefrectomía parcial, solo se extirpa la parte del riñón que contiene el cáncer y se lleva a cabo con menos frecuencia. En algunas circunstancias, se puede llevar a cabo la eliminación de la metástasis secundaria para aliviar síntomas tales como el dolor. Sin embargo, normalmente no ayuda en términos de pronóstico y solo se intentará si es fácil llegar al cáncer y se puede realizar la cirugía sin causar efectos secundarios graves. La embolización arterial es un procedimiento que se hace para bloquear la arteria del riñón que contiene el cáncer. Este procedimiento se puede hacer para controlar un tumor primario que la cirugía no puede extirpar, u ocasionalmente antes de una operación para hacer la cirugía más fácil.

55 A veces se usa la radioterapia en lugar de la cirugía para pacientes que están demasiado enfermos para someterse a una operación principal. En algunas circunstancias, se puede usar para ayudar con los síntomas que surgen como resultado de los cánceres recurrentes o avanzados. Sin embargo, los cánceres de riñón de células renales no son particularmente sensibles a la radioterapia y su uso no es rutinario, porque los estudios no han mostrado que su uso mejore la prognosis.

60 El tratamiento inmunoterapéutico más habitual usa citoquinas interleuquina-2 e interferón alfa para el tratamiento del cáncer de riñón avanzado (metastático).

65 Cáncer colorrectal

Excluyendo los cánceres de piel, el cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común diagnosticado en hombres y mujeres en Estados Unidos. La cirugía es el tratamiento principal para el cáncer colorrectal. La terapia con radiación se usa con frecuencia después de la cirugía para matar los depósitos no extirpados y prevenir las recidivas locales. También se puede usar la quimioterapia posquirúrgica, con fármacos tales como el fluorouracilo (5-FU),
 5 opcionalmente con leucovorina o levamisol, e irinotecán (CPT-11). No hay fármacos inmunoterapéuticos aprobados en general para el tratamiento del cáncer colorrectal, a pesar del hecho de que la inmunoterapia puede ofrecer el mayor potencial después de la resección quirúrgica en el tratamiento posquirúrgico. Sin embargo, el edrecolomab (anticuerpo monoclonal 17-1A, o Panorex) es un tratamiento posquirúrgico para el cáncer colorrectal que está en ensayos clínicos en el Reino Unido y Estados Unidos, y que ya se ha aprobado en Alemania. Por lo tanto, la
 10 identificación de nuevos objetivos adecuados o antígenos para la inmunoterapia del cáncer colorrectal es muy importante.

Breve resumen de la invención

15 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la proteína CD27L presenta una expresión elevada en los cánceres derivados de células epiteliales, en especial el cáncer de riñón y cáncer colorrectal. La expresión elevada de CD27L es útil para el diagnóstico así como un objetivo para el tratamiento terapéutico. CD27L es un ligando que se une al receptor de citoquinas CD27 encontrado en la superficie de los linfocitos T y B humanos (documentos US 5.573.924; US 5.716.805; WO 94/05691; Goodwin y col. (1993) *Cell* 73 (3): 447 – 456). Se
 20 identificó originalmente como CD70, véase Hintzen y col., *Int. Immunol.*, (1994), 6 (3), pág. 477 – 80. Un estudio publicado en 1991 usaba anticuerpos monoclonales contra diferentes antígenos de activación incluyendo CD70/CD27L e identificaron que CD70/CD27L tenía una expresión alta en linfocitos B y T activados (Paloczi K. y col., (1991), *Haematologica*, 24 (2), pág. 83 – 90). Para evitar confusiones, la proteína se denominará en lo sucesivo CD27L.

25 La presente invención proporciona un procedimiento para cribar y/o diagnosticar la terapia de cáncer de células renales, en un sujeto, cuyo procedimiento comprende la etapa de detectar y/o cuantificar en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, un polipéptido CD27L que:

30 (a) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 2); en el que dicha etapa comprende el uso de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido CD27L.

En otra realización, el nivel del polipéptido CD27L se compara con un intervalo o control de referencia.

35 Los polipéptidos descritos en (a) antes, se denominan en lo sucesivo “polipéptidos CD27L”. El término “polipéptidos” incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se usan de forma intercambiable salvo que se especifique lo contrario.

Una molécula de ácido nucleico de CD27L:

40 (d) comprende o consiste en la secuencia de ADN mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 1) o su ARN equivalente;

(e) tiene una secuencia que es complementaria a las secuencias de (d);

45 (f) tiene una secuencia que codifica un polipéptido como se han definido en (a) a (c) antes;

(g) tiene una secuencia que presenta una identidad sustancial con cualquiera de las de (d), (e) y (f); o

50 (h) es un fragmento de (d), (e), (f) o (g), que tiene al menos 8 nucleótidos de longitud.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en (d) a (h) antes, se denominan en lo sucesivo “ácidos nucleicos de CD27L”.

55 El cáncer derivado de células epiteliales es cáncer de riñón, específicamente el cáncer de riñón es cáncer de células renales. El sujeto puede ser un mamífero y preferiblemente es un ser humano.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo que se une específicamente a CD27L, en la fabricación de una composición para el tratamiento del cáncer de células renales, estando dicho anticuerpo conjugado a un agente terapéutico o resto de fármaco.

60 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a CD27L, para usar en el tratamiento del cáncer de células renales, estando dicho anticuerpo conjugado a un agente terapéutico o resto de fármaco.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une específicamente a CD27L, para usar en el tratamiento del cáncer de células renales, estando dicho

anticuerpo conjugado a un agente terapéutico o resto de fármaco.

En los aspectos anteriores, los polipéptidos o fragmentos de los mismos se pueden proporcionar de una forma aislada o recombinante, y se pueden fusionar con otros restos. Los polipéptidos o fragmentos de los mismos se pueden proporcionar en una forma sustancialmente pura, es decir que carezcan de forma sustancial de otras proteínas. Por lo tanto, se puede proporcionar un polipéptido en una composición en la que es el componente predominante presente (es decir, está presente en un nivel de al menos 50 %; preferiblemente al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 %; cuando se determina en una relación de peso / peso, excluyendo disolventes o vehículos).

En otros aspectos de la invención, el anticuerpo que se une específicamente a CD27L se puede usar como parte de ensayos de diagnóstico, incluyendo ensayos de cribado para identificar la presencia o los casos de cáncer de células renales en un paciente, todo descrito e ilustrado de forma completa en el presente documento. La invención abarca además procedimientos para el seguimiento del tratamiento de cáncer de células renales en un paciente, que comprende la etapa de cuantificar la expresión o actividad de CD27L en un paciente sometido a tratamiento para el cáncer de células renales.

Por consiguiente, la presente invención se entenderá mejor teniendo en cuenta la siguiente descripción detallada, que prosigue con referencia a las siguientes figuras.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) y aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de CD27L. Los espectros de masas en tándem están en negrilla y subrayados.

Figura 2: muestra la distribución tisular del ARNm de CD27L. Los niveles de ARNm en tejidos normales y líneas de células de carcinoma renal se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm se expresan como el número de copias.ng⁻¹ de ADNc.

Figura 3: muestra la expresión de CD27L en tejidos de colon normales y tumorales. Los niveles de ARNm de CD27L en tejidos normales y tumorales correspondientes de tres pacientes, se midieron por la RT-PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm se expresan como el número de copias.ng⁻¹ de ADNc.

Figura 4: muestra la expresión de CD27L en una serie de tejidos tumorales renales, que incluyen dos parejas de tejidos normales y tumorales correspondientes. Los niveles de ARNm de CD27L se midieron por la RT-PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm se expresan como el número de copias.ng⁻¹ de ADNc.

Figura 5: muestra la expresión relativa de CD27L calculada por citometría de flujo usando un anticuerpo dirigido contra CD27L marcado con FITC.

Descripción detallada

Con el fin de apreciar mejor la presente invención, los polipéptidos dentro del alcance de (a) anterior, ahora se discutirán con mayor detalle.

Polipéptidos dentro del alcance de (a):

Un polipéptido dentro del alcance de (a), puede consistir en la secuencia de aminoácidos particular dada en la figura 1 (SEQ ID NO: 2) o puede tener una secuencia de aminoácidos N-terminal adicional y/o C-terminal adicional con respecto a la secuencia dada en la figura 1 (SEQ ID NO: 2). Las secuencias N-terminal o C-terminal adicionales se pueden proporcionar por diferentes razones. Las técnicas para proporcionar dichas secuencias adicionales son bien conocidas en la materia. Las secuencias adicionales se pueden proporcionar con el fin de alterar las características de un polipéptido particular. Esto puede ser útil para mejorar la expresión o regulación de la expresión en sistemas de expresión particulares. Por ejemplo, una secuencia adicional puede proporcionar alguna protección frente a la escisión proteolítica. Esto se puede hacer para la hormona somatostatina fusionándola en su extremo N a parte de la enzima galactosidasa β (Itakwa y col. (1977) *Science* 198 : 105 – 63).

Secuencias adicionales también pueden ser útiles para alterar las propiedades de un polipéptido para ayudar en la identificación o purificación. Por ejemplo, se puede proporcionar una proteína de fusión en la que un polipéptido está ligado a un resto capaz de ser aislado por cromatografía de afinidad. El resto puede ser un antígeno o un epítipo y la columna de afinidad puede comprender anticuerpos inmovilizados o fragmentos de anticuerpos inmovilizados que se unen a dicho antígeno o epítipo (convenientemente con un grado alto de especificidad). La proteína de fusión normalmente se puede eluir de la columna por adición de un tampón adecuado. Sin embargo, pueden estar presentes secuencias N-terminales o C-terminales adicionales, simplemente como resultado de una técnica particular usada para obtener un polipéptido de la presente invención, y no es necesario que proporcionen ninguna característica ventajosa particular al polipéptido de la presente invención. Dichos polipéptidos están dentro del

alcance de la presente invención.

Esté presente una secuencia N-terminal o C-terminal adicional, se prefiere que el polipéptido resultante presente la capacidad de unirse al polipéptido CD27L como se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO: 2).

5 Con el fin de apreciar mejor la presente invención, ahora se discutirán los ácidos nucleicos dentro del alcance de (d)-(h) anteriores, con mayor detalle.

10 Los polipéptidos CD27L pueden ser codificados por una gran variedad de moléculas de ácido nucleico, teniendo en cuenta la degeneración del código genético bien conocida. Todas estas moléculas se pueden usar en la presente invención. Se pueden insertar en vectores y clonar para proporcionar grandes cantidades de ADN o ARN para el posterior estudio. Se pueden introducir vectores adecuados en células huésped para permitir la expresión de polipéptidos de la presente invención usando técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

15 Las técnicas para la clonación, expresión y purificación de polipéptidos son bien conocidas para el experto en la materia. Las construcciones de ADN se pueden generar fácilmente usando procedimientos bien conocidos en la materia. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., *Molecular Cloning* 2^a Edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989); en Old y Primrose, *Principles of Gene Manipulation* 5^a Edición, Blackwell Scientific Publications (1994); y en Stryer [*Biochemistry* 4^a Edición, W H Freeman and Company (1995)]. Por lo tanto, pueden facilitarse las modificaciones de las construcciones de ADN y las proteínas expresadas tales como la adición de promotores, potenciadores, secuencias señal, secuencias líder, señales de inicio y parada de la traducción y regiones de control de la estabilidad del ADN, o la adición de parejas de fusión.

25 Normalmente, la construcción de ADN se insertará en un vector, que puede ser de origen fago o plásmido. La expresión de la proteína se logra por la transformación o transfección del vector en una célula huésped que puede ser de origen eucariota o procariota. Dichos vectores y células huésped adecuadas forman el tercer y el cuarto aspecto de la presente invención.

30 El conocimiento de la estructura del ácido nucleico se puede usar para producir anticuerpos y para la terapia génica. Las técnicas para esto son bien conocidas para el experto en la materia.

Usando los sistemas de expresión adecuados, los polipéptidos CD27L se pueden expresar en una forma glicosilada o no glicosilada. Las formas no glicosiladas se pueden producir por expresión en huéspedes procariotas tales como *E. coli*.

35 Los polipéptidos que comprenden metionina N-terminal se pueden producir usando determinados sistemas de expresión, mientras que en otros el polipéptido maduro carecerá de este resto.

40 Las técnicas preferidas para la clonación, expresión y purificación de un polipéptido CD27L se resumen a continuación.

45 Los polipéptidos se pueden preparar de forma natural o en condiciones desnaturalizantes y después posteriormente volver a plegarlos. Los vectores de expresión de baculovirus incluyen plásmidos de secreción (tales como pACGP67 de Pharmingen), que pueden tener una secuencia de marcador de epítipo clonada en el marco (por ejemplo myc, V5 o His) para ayudar a la detección y permitir la posterior purificación de la proteína. Los vectores de expresión de mamíferos pueden incluir pCDNA3 y pSecTag (ambos de Invitrogen), y pREP9 y pCEP4 (Invitrogen). Los sistemas de *E. coli* incluyen las series pBad (marcado con His - Invitrogen) o series pGex (Pharmacia).

50 El término "identidad" se puede usar para describir la similitud entre dos secuencias de ADN individuales. El programa "Bestfit" (Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 482 – 489 (1981)) es un ejemplo de un tipo de software de ordenador usado para encontrar el segmento mejor de similitud entre dos secuencias de ácido nucleico, mientras que el programa GAP permite alinear secuencias a lo largo de toda su longitud y encontrar el alineamiento óptimo insertando espacios en cualquiera de las secuencias según sea adecuado. Se prefiere que las secuencias que muestran una identidad sustancial con cualquiera de las de (d), (e) o (f) tengan una identidad de secuencia de, por ejemplo, al menos 50 % , al menos 75 % , al menos 80 % , al menos 85 % , al menos 90 % , al menos 95 % o al menos 98 % .

60 Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos CD27L, denominadas en el presente documento moléculas de ácido nucleico "codificantes", la presente invención también incluye moléculas de ácido nucleico complementarias a estas. Así, por ejemplo, se pueden usar ambas cadenas de una molécula de ácido nucleico bicatenaria en la presente invención (estén o no asociadas entre sí). También están incluidas moléculas de ARN, y moléculas de ADN complementario (por ejemplo, moléculas de ADNc).

65 Las moléculas de ácido nucleico que pueden hibridar con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico discutidas antes, también se pueden usar en la presente invención. Dichas moléculas de ácido nucleico se denominan en el presente documento moléculas de ácido nucleico "que hibridan". Las moléculas de ácido nucleico que hibridan

pueden ser útiles como sondas o cebadores, por ejemplo. Es deseable que dichas moléculas que hibridan tengan al menos 10 nucleótidos de longitud, y preferiblemente tengan al menos 25 o al menos 50 nucleótidos de longitud. Las moléculas de ácido nucleico que hibridan preferiblemente hibridan con ácidos nucleicos dentro del alcance de (d), (e), (f) o (g) anteriores, específicamente. Es deseable que las moléculas que hibridan, hibriden con dichas moléculas en condiciones de hibridación restrictivas. Un ejemplo de condiciones de hibridación restrictivas es cuando la hibridación intentada se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C, usando una disolución salina que es aproximadamente 0,9 molar. Sin embargo, el experto en la materia podrá variar dichas condiciones según sea adecuado con el fin de tener en cuenta variables tales como la longitud de la sonda, composición de bases, tipo de iones presentes, etc.

La manipulación del ADN que codifica la proteína es una técnica particularmente poderosa tanto para modificar proteínas como para generar grandes cantidades de proteína destinadas a la purificación. Esto puede implicar el uso de técnicas de PCR para amplificar una secuencia de ácido nucleico deseada. Por lo tanto, los datos de secuencia proporcionados en el presente documento se pueden usar para diseñar cebadores para usar en la PCR, de modo que se puede dirigir a una secuencia deseada y después amplificarla con un grado alto. Típicamente, los cebadores tendrán al menos 5 nucleótidos de longitud, y en general tendrán al menos 10 nucleótidos de longitud (por ejemplo, de 15 a 20 nucleótidos de longitud). En algunos casos, se pueden usar cebadores de al menos 30 o al menos 35 nucleótidos de longitud.

Como otra alternativa, se puede usar la síntesis química. Esta puede ser automática. Se pueden sintetizar químicamente y ligar entre sí secuencias relativamente cortas para proporcionar una secuencia más larga. Además de usarse como cebadores y/o sondas, las moléculas de ácido nucleico que hibridan de la presente invención, se pueden usar como moléculas no codificantes para alterar la expresión de los polipéptidos CD27L uniéndose a las moléculas de ácido nucleico complementario. Esta técnica se puede usar en la terapia con cadena no codificante. Una molécula de ácido nucleico que hibrida de la presente invención puede tener un grado alto de identidad de secuencia junto con su longitud con una molécula de ácido nucleico dentro del alcance de (d) – (h) anteriores (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 %). Como apreciará el experto en la materia, cuanto mayor es la identidad de secuencia que tiene una molécula de ácido nucleico monocatenaria dada con otra molécula de ácido nucleico, mayor es la probabilidad de que hibride con una molécula de ácido nucleico que es complementaria de esa otra molécula de ácido nucleico en condiciones adecuadas.

La expresión “ARN equivalente” cuando se ha usado antes, indica que una molécula de ARN dada tiene una secuencia que es complementaria a la de una molécula de ADN dada, teniendo en cuenta el hecho de que en el ARN el “U” sustituye a la “T” en el código genético. La molécula de ácido nucleico puede estar en forma aislada, recombinante o químicamente sintetizada.

En vista de la descripción anterior, el experto en la materia apreciará que un gran número de ácidos nucleicos están dentro del alcance de la presente invención. Salvo que el contexto indique otra cosa, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden tener además una o más de las siguientes características:

- pueden ser monocatenarias o bicatenarias,

- se pueden proporcionar en forma recombinante, es decir, unidas covalentemente a una secuencia flanqueadora 5' y/o 3' para proporcionar una molécula que no se encuentra en la naturaleza,

- se pueden proporcionar sin las secuencias flanqueadoras 5' y/o 3' que se encuentran normalmente en la naturaleza, y

- se pueden proporcionar en forma sustancialmente pura. Por lo tanto, se pueden proporcionar en una forma que carece sustancialmente de proteínas contaminantes y/o de otros ácidos nucleicos.

Como se describe en el presente documento, CD27L está asociada con el cáncer derivado de células epiteliales, en particular el cáncer de riñón y/o cáncer colorrectal, y por lo tanto proporciona un medio de detección y/o diagnóstico. En una realización, un medio conveniente para dicha detección, cuantificación, cribado, diagnóstico, profilaxis o tratamiento terapéutico, implicará el uso de anticuerpos. Por lo tanto, los polipéptidos CD27L también tienen uso en la producción de anticuerpos. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención usa anticuerpos que se unen a un polipéptido CD27L. Los anticuerpos preferidos se unen específicamente a los polipéptidos CD27L de modo que se pueden usar para purificar y/o inhibir la actividad de dichos polipéptidos.

Por lo tanto, los polipéptidos CD27L se pueden usar como inmunógenos para generar anticuerpos que se unen de modo inmunoespecífico a un polipéptido CD27L. Estos se denominan anticuerpos de CD27L. Los anticuerpos de CD27L incluyen, pero sin limitar, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab y fragmentos F (ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos andidiopáticos (anti-Id), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. El término “anticuerpo” como se usa en el presente documento se refiere a moléculas de inmunoglobulina

y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

5 En la producción de anticuerpos, el cribado del anticuerpo deseado se puede llevar a cabo por técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un dominio específico de un polipéptido CD27L, se pueden ensayar los hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de polipéptido que contiene dicho dominio. Para la selección de un anticuerpo que se une específicamente a un primer homólogo del polipéptido, pero que no se une específicamente
10 (o se une con menos avidez) a un segundo homólogo del polipéptido, se puede hacer la selección basándose en la unión positiva al primer homólogo del polipéptido y la falta de unión (o unión reducida) al segundo homólogo del polipéptido.

15 Para preparar anticuerpos monoclonales (mAb) de CD27L, se puede usar cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo. Por ejemplo, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256 : 495 – 497), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor y col., 1983, *Immunology Today* 4 : 72), y la técnica del hibridoma-EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 – 96). Dichos anticuerpos pueden ser cualquier clase de
20 inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los mAb de la invención se puede cultivar in vitro o in vivo. En una realización adicional de la invención, los mAb se pueden producir en animales sin gérmenes, usando tecnología conocida (documento PCT/US90/02545).

25 Los mAb incluyen, pero sin limitar, mAb humanos y mAb quiméricos (por ejemplo quimeras de humano-ratón). Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes derivan de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región constante de la inmunoglobulina humana y una región variable derivada de un mAb murino. (Véase los documentos U.S. 4.816.567; y U.S. 4.816.397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especie no humana que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región armazón de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, el
30 documento U.S. 5.585.089).

Los mAb quiméricos y humanizados se pueden producir por técnicas de ADN recombinantes conocidas en la materia, por ejemplo, usando los procedimientos descritos en los documentos WO 87/02671; EP 184187; EP 171496; EP 173494; WO 86/01533; U.S. 4.816.567; EP 125023; Better y col. (1988) *Science* 240 : 1041 – 1043; Liu y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 3439 – 3443; Liu y col. (1987) *J. Immunol.* 139 : 3521 – 3526; Sun y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 214 – 218; Nishimura y col. (1987) *Canc. Res.* 47 : 999 – 1005; Wood y col. (1985) *Nature* 314 : 446 – 449; y Shaw y col. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80 : 1553 – 1559; Morrison (1985) *Science* 229 : 1202 – 1207; Oi y col. (1986) *Bio/Techniques* 4 : 214; patente de EE.UU. 5.225.539; Jones y col. (1986) *Nature* 321 : 552 – 525; Verhoevan y col. (1988) *Science* 239 : 1534; y Beidler y col. (1988) *J. Immunol.* 141 : 4053 – 4060.
40

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Dichos anticuerpos se pueden producir usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes endógenos de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, pero que pueden expresar los genes de las cadenas pesada y ligera humanas. Los ratones transgénicos se inmunizan de la forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una parte de un polipéptido CD27L. Los mAb dirigidos contra el antígeno se pueden obtener usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, se pueden producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una revisión de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13 : 65 – 93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y mAb humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.625.126; patente de EE.UU. 5.633.425; patente de EE.UU. 5.569.825; patente de EE.UU. 5.661.016; y patente de EE.UU. 5.545.806.
50

55 Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar usando una técnica denominada “selección guiada”. En este procedimiento, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers y col. (1994) *Bio/technology* 12 : 899 – 903).

60 Los anticuerpos de CD27L también se pueden generar usando diferentes procedimientos de presentación de fago conocidos en la técnica. En los procedimientos de presentación de fago, se presentan dominios de anticuerpos funcionales sobre la superficie de partículas de fago que llevan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, dicho fago se puede usar para presentar dominios de unión al antígeno expresados de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humana o murina). El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés, se puede seleccionar o identificar con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos
65

procedimientos típicamente son fagos filamentosos que incluyen fd y M13 que se unen a dominios expresados por fagos con dominios de anticuerpos Fab, Fv o Fv estabilizado por disulfuro, fusionados de forma recombinante a la proteína del gen III o el gen VIII del fago. Los procedimientos de presentación de fagos que se pueden usar para hacer los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman y col. (1995) *J. Immunol. Methods* 182 : 41 – 50; Ames y col. (1995) *J. Immunol. Methods* 184 : 177 – 186; Kettleborough y col. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24 : 952 – 958; Persic y col. (1997) *Gene* 187 9 – 18; Burton y col. (1994) *Advances in Immunology* 57 : 191 – 280; solicitud PCT n° PCT/GB91/01134; documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y patentes de EE.UU. n° 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 y 5969108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fago, se pueden aislar las regiones codificantes de anticuerpos de los fagos, y usarlas para generar los anticuerpos enteros, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresar en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células de plantas, levaduras y bacterias, por ejemplo como se describe con detalle más adelante. Por ejemplo, también se pueden usar técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F (ab')₂, usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en el documento WO 92/22324; Mullinax y col. (1992) *BioTechniques* 12 (6) : 864 – 869; y Sawai y col. (1995) *AJRI* 34 : 26 – 34 y Better y col. (1988) *Science* 240 : 1041 – 1043.

Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv y anticuerpos monocatenarios incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. 4.946.778 y 5.258.498; Huston y col. (1991) *Methods in Enzymology* 203 : 46 – 88; Shu y col. (1993) *PNAS* 90 : 7995 – 7999; y Skerra y col. (1988) *Science* 240 : 1038 – 1040.

La invención proporciona además el uso de anticuerpos biespecíficos, que se pueden hacer por procedimientos conocidos en la materia. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Milstein y col., 1983, *Nature* 305 : 537 – 539). Debido a la agrupación aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una potencial mezcla de 10 moléculas diferentes de anticuerpo, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se hace mediante etapas de cromatografía de afinidad es bastante difícil, y los rendimientos de producto son bajos. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker y col., 1991, *EMBO J.* 10 : 3655 – 3659.

De acuerdo con un procedimiento diferente y más preferido, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH₂ y CH₃. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH₁) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan a un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión, cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales produce rendimientos altos o cuando las relaciones no tienen particular importancia.

En una realización de este procedimiento, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha encontrado que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este procedimiento se describe en el documento WO 94/04690. Para más detalles para la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 1986, 121 : 210.

La invención también usa fragmentos, derivados o análogos funcionalmente activos de los anticuerpos de CD27L. Funcionalmente activo significa que el fragmento, derivado o análogo puede provocar anticuerpos anti-anti-idiotípicos (es decir, anticuerpos terciarios) que reconocen el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo del cual deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una realización preferida, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina se puede potenciar mediante eliminación de las secuencias de armazón y CDR que son C-terminales respecto a la secuencia CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar las secuencias CDR de unión al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen secuencias CDR en ensayos de unión con el antígeno, mediante cualquier procedimiento de ensayo de unión conocido en la materia.

La presente invención usa fragmentos de anticuerpo tales como, pero sin limitar, fragmentos F (ab')₂ y fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos se pueden generar por técnicas conocidas. Los fragmentos F (ab')₂ consisten en la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada, y son generados por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab son generados reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F (ab')₂. Esta invención también proporciona dímeros de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos de la invención, o cualquier fragmento mínimo de los mismos tal como Fv o anticuerpos monocatenarios (SCA) (por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. 4946778; Bird (1988) *Science* 242 : 423 – 42; Huston y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 5879 – 5883; y Ward y col. (1989) *Nature* 334 : 544 – 54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo de la invención. Los anticuerpos monocatenarios se forman por la unión de fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv por un puente de aminoácido, produciendo un polipéptido monocatenario. Se pueden usar técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra y col. (1988) *Science* 242 : 1038 – 1041).

En otras realizaciones, la invención usa proteínas de fusión de los anticuerpos de CD27L (o fragmentos de los mismos funcionalmente activos), por ejemplo, en las que la inmunoglobulina se fusiona mediante un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico) al extremo N o al extremo C de una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o parte de la misma, preferiblemente una parte de la proteína de al menos 10, 20 ó 50 aminoácidos) que no es la inmunoglobulina. Preferiblemente, el anticuerpo de CD27L, o fragmento del mismo, está covalentemente unido a la otra proteína en el extremo N del dominio constante. Como se ha expuesto antes, dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, aumentar la semivida in vivo, y potenciar la liberación de un antígeno a través de la barrera epitelial al sistema inmunitario.

Los anticuerpos de CD27L usados incluyen análogos y derivados que son modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula, siempre que dicha unión covalente no perjudique la unión inmuno-específica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos de CD27L incluyen aquellos que se han modificado más, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores / bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Se puede llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitar, la escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Además, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos de CD27L anteriores se pueden usar en procedimientos conocidos en la técnica que se refieren a la localización y actividad de los polipéptidos CD27L, por ejemplo, para generación de imágenes o radiomágenes de esas proteínas, medición de sus niveles en muestras fisiológicas adecuadas, en procedimientos de diagnóstico, etc., y para radioterapia.

Los anticuerpos de CD27L se pueden producir por cualquier procedimiento conocido en la materia para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o por expresión recombinante, y se producen preferiblemente por una técnica de expresión recombinante.

La expresión recombinante de anticuerpos de CD27L requiere la construcción de un ácido nucleico que codifique el anticuerpo. Si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, se puede ensamblar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier y col. (1994) *BioTechniques* 17 : 242), que, de forma resumida, implica la síntesis de oligonucleótidos que se superponen que contienen partes de la secuencia que codifica el anticuerpo, la reasociación y ligado de estos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados por la PCR.

Alternativamente, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede obtener por clonación del anticuerpo. Si no está disponible un clon que contenga el ácido nucleico que codifica el anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, se puede obtener un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos, o biblioteca de ADNc generada a partir de cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo) por amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia de gen particular.

Si no está disponible una molécula de anticuerpo que reconoce específicamente a un antígeno particular (o una fuente para una biblioteca de ADNc para la clonación de un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo), los anticuerpos específicos para un antígeno particular se pueden generar por cualquier procedimiento conocido en la materia, por ejemplo, inmunizando un animal, tal como un conejo, para generar anticuerpos policlonales o, más preferiblemente, generando anticuerpos monoclonales. Alternativamente, se puede obtener un clon que codifica al menos una parte Fab del anticuerpo mediante cribado en bibliotecas de expresión de Fab (por ejemplo, como se describe en Huse y col., 1989, *Science* 246 : 1275 – 1281) de clones de fragmentos Fab que se unen al antígeno específico o por cribado en bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Clackson y col., 1991, *Nature* 352 : 624; Hane y col., 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 4937).

Una vez obtenido un ácido nucleico que codifica al menos el dominio variable de la molécula de anticuerpo, se

puede introducir en un vector que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, los documentos WO 86/05807; WO 89/01036; y U.S. 5.122.464). También están disponibles los vectores que contienen la cadena ligera o pesada completa para la expresión conjunta con el ácido nucleico para permitir la expresión de una molécula de anticuerpo completo. Después, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede usar para introducir la o las sustituciones o la o las eliminaciones de nucleótidos necesarias para sustituir (o eliminar) el uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro entre cadenas con un resto de aminoácidos que no contiene un grupo sulfhidrilo. Dichas modificaciones se pueden llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido en la materia para introducir mutaciones o eliminaciones específicas en una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, pero sin limitar, mutagénesis química, mutagénesis dirigida de sitio específico in vitro (Hutchinson y col., 1978, *J. Biol. Chem.* 253 : 6551), procedimientos basados en la PCR, etc.

Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos” (Morrison y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 : 851 – 855; Neuberger y col. (1984) *Nature* 312 : 604 – 608; Takeda y col. *Nature* 314 : 452 – 454) mediante corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno adecuada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica adecuada. Como se ha descrito antes, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes derivan de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de anticuerpo humano, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Una vez obtenido un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de CD27L, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo se puede producir por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia. Por lo tanto, en el presente documento se describen los procedimientos para preparar la proteína de la invención expresando el ácido nucleico que contiene las secuencias de la molécula de anticuerpo. Se pueden usar procedimientos bien conocidos para los expertos en la materia para la construcción de vectores de expresión que contienen secuencias que codifican la molécula de anticuerpo y señales de control de la traducción y transcripción adecuadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y la recombinación genética in vivo. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col. (1990), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) y Ausubel y col. (eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY).

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped por técnicas convencionales y las células transfectadas después se cultivan por técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención.

Las células huésped usadas para expresar el anticuerpo de CD27L recombinante pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o preferiblemente células eucariotas, en especial para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante entera. En particular, las células de mamífero como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano inmediato principal del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking y col. (1998) *Gene* 45 : 101; Cockett y col. (1990) *Bio/Technology* 8 : 2).

Se puede usar una variedad de sistemas de vectores de expresión de huéspedes para expresar un anticuerpo de CD27L. Dichos sistemas de expresión de huéspedes representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias codificantes de interés y posteriormente purificar, pero también representan células que, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias de nucleótidos codificantes adecuadas, expresan la molécula de anticuerpo de la invención in situ. Estos incluyen, pero sin limitar, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen las secuencias que codifican el anticuerpo; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen las secuencias que codifican el anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican el anticuerpo; sistemas de células vegetales con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen las secuencias que codifican el anticuerpo; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, HEK 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína), o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; promotor de 7,5 K del virus vaccinia).

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente una serie de vectores de expresión dependiendo del uso al que van dirigidos, para expresar la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de anticuerpo, pueden ser convenientes vectores que dirigen la expresión de niveles altos de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitar, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., 1983, *EMBO J.* 2 : 1791), en el que la secuencia que codifica el anticuerpo se puede ligar individualmente en el vector en el marco con la región codificante lac Z de modo que se produce una proteína de

fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13 : 3101 – 3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24 : 5503 – 5509); y similares. También se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para que incluyan sitios de escisión de la proteasa trombina o factor Xa, de modo que el producto del gen diana clonado se puede liberar del resto de GST.

En un sistema de insecto, se usa el virus de la poliedrosis nuclear, *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños. Los virus crecen en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica el anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la poliedrina) del virus y ponerlos bajo el control de un promotor del AcNPV (por ejemplo el promotor de la poliedrina). En células huésped de mamífero, se puede usar una serie de sistemas de expresión basados en virus (por ejemplo, un sistema de expresión de adenovirus).

Como se ha discutido antes, se puede elegir una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína.

Para la producción de alto rendimiento de larga duración de los anticuerpos recombinantes de CD27L, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden producir líneas celulares que expresan de forma estable un anticuerpo de CD27L por transfección de las células con un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos del anticuerpo y la secuencia de nucleótidos de un marcador seleccionable (por ejemplo, neomicina o higromicina), y seleccionar la expresión del marcador seleccionable. Dichas líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de agentes que interactúan directamente o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Los niveles de expresión de la molécula de anticuerpo se pueden aumentar por amplificación del vector (para una revisión véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresan el anticuerpo se puede amplificar, el aumento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen del marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse y col., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3 : 257).

La célula huésped se puede transfectar conjuntamente con dos vectores de expresión, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera. Alternativamente, se puede usar un solo vector que codifica los polipéptidos tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debe situarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de la cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, *Nature* 322 : 52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender el ADNc o ADN genómico.

Una vez que la molécula de anticuerpo de CD27L se ha expresado de forma recombinante, se puede purificar por cualquier procedimiento conocido en la materia para la purificación de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad tal como con proteína A o antígeno específico, y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

Alternativamente, cualquier proteína de fusión se puede purificar fácilmente usando un anticuerpo específico para la proteína de fusión que se va a expresar. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht y col. permite la purificación fácil de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht y col. (1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 8972 – 897). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vaccinia de modo que el marco de lectura abierto del gen se fusiona traduccionalmente a un marcador amino terminal que consiste en 6 restos de histidina. El marcador sirve como un dominio de unión a la matriz para la proteína de fusión. Los extractos de células infectadas con virus vaccinia recombinante se cargan en columnas de ácido nitriloacético Ni²⁺ -agarosa y las proteínas marcadas con histidina eluyen selectivamente con tampones que contienen imidazol.

En una realización preferida, los anticuerpos de CD27L o fragmentos de los mismos se conjugan con un resto de diagnóstico. Los anticuerpos de CD27L se pueden usar para diagnóstico o para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar por acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diferentes enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radiactivos, metales que emiten positrones (para

usar en la tomografía de emisión de positrones), e iones metales paramagnéticos no radiactivos. Véase en general el documento U.S. 4741900 para los iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para usar como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Las enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de sansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aecorina; y los nucleidos radiactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In y ⁹⁹Tc.

Los anticuerpos de CD27L para usar en el tratamiento del cáncer de células renales se conjugan con un agente terapéutico o resto de fármaco. El agente terapéutico o resto de fármaco no se debe considerar limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que tienen una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina; o, un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 2 (IL-2), interleuquina 6 (IL-6), factor estimulador de la colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de la colonia de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para la conjugación de dicho resto terapéutico a los anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Amon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col. (eds.), pág. 243 – 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2ª Ed.)*, Robinson y col. (eds.), pág. 623 – 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y col. (eds.), pág. 475 – 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. (eds.), pág. 303 – 16 (Academic Press 1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62 : 119 – 58 (1982).

Alternativamente, un anticuerpo se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe en la patente de EE.UU. nº 4676980.

Un anticuerpo con un resto terapéutico conjugado al mismo, se puede usar como un producto terapéutico que se administra solo o en combinación con un factor o factores citotóxicos y/o citoquinas.

Los procedimientos de diagnóstico de acuerdo con la presente invención, se pueden llevar a cabo usando una serie de procedimientos conocidos para el experto en la materia, que incluyen, sin limitación, la inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, electroforesis en gel bidimensional, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, inmunoensayos, por ejemplo, transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitinas, reacciones de precipitinas de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos de fluorescencia e inmunoensayos de proteína A.

Los kits de diagnóstico pueden comprender un reactivo de captura (por ejemplo, un anticuerpo) contra un polipéptido CD27L como se ha definido antes. Además, dicho kit puede comprender opcionalmente uno o más de los siguientes:

(1) instrucciones para usar el reactivo de captura para el diagnóstico, prognosis, seguimiento terapéutico o cualquier combinación de estas aplicaciones;

(2) una pareja de unión marcada del reactivo de captura;

(3) una fase sólida (tal como una tira reactiva) sobre la que se inmoviliza el reactivo de captura; y

(4) una etiqueta o inserto que indica la autorización de las entidades reguladoras para el diagnóstico, prognosis o uso terapéutico o cualquier combinación de los mismos.

Si no se proporciona pareja de unión marcada del reactivo de captura, el propio reactivo de captura contra el polipéptido se puede marcar con un marcador detectable, por ejemplo, un resto quimioluminiscente, enzimático, fluorescente o radiactivo (véase antes).

Un kit de diagnóstico comprende en uno o más envases una pareja de cebadores que en condiciones de reacción adecuadas pueden cebar la amplificación de al menos una parte de la molécula de ácido nucleico de CD27L, tal como por reacción en cadena de la polimerasa (véase, por ejemplo, Innis y col., 1990, *PCR Protocols*, Academic

Press, Inc., San Diego, CA), reacción en cadena de la ligasa (véase el documento EP 320308) uso de la replicasa Q β , reacción cíclica con sonda, u otros procedimientos conocidos en la materia. Típicamente, los cebadores tienen al menos 5 nucleótidos de longitud y preferiblemente tienen al menos de 10 a 25 nucleótidos de longitud y más preferiblemente de 15 a 25 nucleótidos de longitud. En algunos casos, se pueden usar cebadores de al menos 30 o al menos 35 nucleótidos de longitud.

La muestra biológica se puede obtener de cualquier fuente, tal como una muestra de suero o una muestra de tejido, por ejemplo tejido de riñón o colon. Cuando se buscan pruebas de metástasis, se pueden mirar sitios principales de metástasis cáncer un riñón, tales como los nódulos linfáticos, hígado y páncreas.

Como se discute en el presente documento, los anticuerpos de CD27L son útiles en el tratamiento o la profilaxis del cáncer de células renales. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo de CD27L conjugado con un agente terapéutico o un resto de fármaco, opcionalmente junto con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables para usar en el diagnóstico, tratamiento y/o profilaxis del cáncer de células renales.

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo de CD27L conjugado con un agente terapéutico o resto de fármaco, para usar en el tratamiento del cáncer de células renales. En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de al menos un anticuerpo de CD27L conjugado con un agente terapéutico o resto de fármaco, en la preparación de una composición para usar en el diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento del cáncer de células renales.

La composición normalmente se suministrará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del procedimiento deseado de administración al paciente). Se puede proporcionar en una forma farmacéutica unitaria, en general se proporcionará en un envase sellado y se puede proporcionar como parte de un kit. Dicho kit normalmente (aunque no necesariamente) incluye instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas farmacéuticas unitarias.

La composición farmacéutica puede estar adaptada para la administración por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Dichas composiciones se pueden preparar por cualquier procedimiento conocido en la técnica farmacéutica, por ejemplo mezclando el principio activo con el o los vehículos o excipientes en condiciones estériles.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como disoluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos; o como espumas o batidos comestibles; o como emulsiones). Los excipientes adecuados para comprimidos o cápsulas de gelatina dura incluyen lactosa, almidón de maíz o derivados del mismo, ácido esteárico o sales del mismo. Los excipientes adecuados para usar con cápsulas de gelatina blanda incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos etc. Para la preparación de disoluciones y jarabes, los excipientes que se pueden usar incluyen, por ejemplo, agua, polioles y azúcares. Para la preparación de suspensiones, se pueden usar aceites (por ejemplo aceites vegetales) para proporcionar suspensiones de aceite en agua o de agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica se pueden presentar en forma de parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, el principio activo se puede liberar del parche por iontoforesis como se describe en general en *Pharmaceutical Research* (1986) 3 (6) : 318.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites. Para infecciones del ojo o de otros tejidos externos, por ejemplo de la boca y la piel, las composiciones se aplican preferiblemente en forma de una pomada o crema tópica. Cuando se fórmula en una pomada, el principio activo se puede usar con una base de pomada parafínica o miscible con agua. Alternativamente, el principio activo se puede formular en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en el ojo incluyen gotas oculares en las que el principio activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, en especial un disolvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, pastillas y lavados bucales.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal se pueden presentar en forma de supositorios o enemas.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración nasal en las que el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partículas, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros,

que se administra de manera que se toma una aspiración, es decir mediante inhalación rápida a través de la fosa nasal desde un envase con el polvo mantenido cerca de la nariz. Las composiciones adecuadas en las que el vínculo es un líquido, para la administración como un pulverizador nasal o como gotas nasales, incluyen disoluciones acuosas o de aceite del principio activo.

5 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración por inhalación incluyen polvos de partículas finas o vaporizaciones que se pueden generar mediante diferentes tipos de aerosoles dosificaciones presurizados, nebulizadores o insufladores.

10 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverizador.

15 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen disolución para inyección estéril acuosa y no acuosa que puede contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen a la formulación sustancialmente isotónica con la sangre del receptor al que va destinado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los excipientes que se pueden usar para disoluciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones se pueden presentar en envases de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y se pueden conservar en condiciones liofilizadas que sólo requieren la adición del

20 vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de usar. Las disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

25 Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el agente en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados antes, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración.

30 En algunas realizaciones, los agentes de la invención se pueden formular para asegurar la distribución adecuada in vivo, por ejemplo en liposomas. Para los procedimientos de fabricación de liposomas véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4522811; 5374548; y 5399331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que son transportados selectivamente a las células u órganos específicos, por lo tanto potencian la liberación dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, .V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29 : 685).

35 Los restos dirigidos de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. 5416016); manósidos (Umezaway col., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153 : 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman y col. (1995) *FEBS Lett.* 357 : 140; M. Owais y col. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 : 180); tensioactivo receptor de proteína A (Briscoe y col. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233 : 134), diferentes especies que pueden comprender las formulaciones de las invenciones, así como componentes de las moléculas inventadas; psi 20 (Schreier y col. (1994) *J. Biol. Chem.* 269 : 9090); véase también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346 : 123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4 : 273. En una realización de la invención, los agentes de la invención se

40 formulan en liposomas; en una realización más preferida, los liposomas incluyen un resto dirigido. En una realización más preferida, los agentes en los liposomas se suministran por inyección de bolo en un sitio próximo al tumor.

45 La composición debe ser fluida en la medida en que sea fácil de inyectar con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

50 La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición se puede suministrar mediante jeringa. Además de agua, el vehículo puede ser una disolución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, usando un revestimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y usando tensioactivos. En muchos casos, se prefiere incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol y cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

55 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, odorizantes, sales (se pueden proporcionar los propios agentes de la presente invención en forma de una sal farmacéuticamente aceptable), tampones, agentes de recubrimiento o antioxidantes. También pueden contener agentes terapéuticamente activos además del agente de la presente invención.

60

65 Las dosificaciones del agente de la presente invención pueden variar entre límites amplios, dependiendo de la enfermedad o trastorno que se va a tratar, la edad y el estado del individuo que se va a tratar etc. y en último término un médico determinará la dosificación adecuada que se va a usar. Esta dosificación se puede repetir tan a menudo como sea adecuado. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosificación se puede reducir de acuerdo con la práctica clínica normal.

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar de forma más completa las realizaciones preferidas de la invención. Sin embargo, no deben considerarse de ninguna forma limitantes del alcance de la invención.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación y clonación de CD27L

10 La proteína CD27L se aisló de membranas de células A 498. A 498 es una célula de carcinoma epitelial renal (ATCC nº CRL-7908). Esta célula se cultivó en medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % y L-glutamina 2 mM.

Fraccionamiento de células y generación de membrana plasmática:

15 Se lavaron placas de 10 x 15 cm² de células 3 veces con PBS-CM (cada placa contenía aproximadamente 2 x 10⁸ células). Se añadieron 5 ml de PBS-CM enfriado con hielo a la primera placa y las células se rascaron usando un elevador de células de plástico. Todas las placas se rascaron en este volumen de PBS-CM. Después, las células se centrifugaron a 1000 x g durante 5 min a + 4 °C. Se separó el líquido sobrenadante y las células se volvieron a suspender en 10 ml de tampón de homogeneización (sacarosa 250 mM en HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, vanadato 1 mM, azida al 0,02 %). Las células se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos a + 4 °C y se separó el líquido sobrenadante. El sedimento celular después se volvió a suspender en 5 x volumen de células empaquetadas con tampón de homogeneización más inhibidores de proteasa (Sigma). El homogeneizador de soporte de bolas (BBH) (bola de 8,002 mm) se enfrió y se lavó con tampón de homogeneización. La suspensión de células se recogió en una jeringa de 2 ml y esta se unió a un lado del BBH. Se unió otra jeringa al otro lado del BBH. La mezcla celular se alimentó a través de la cámara hasta 5 veces. Se hizo el seguimiento de las células usando un microscopio y cuando las células se habían lisado suficientemente, la mezcla resultante se centrifugó a 1000 x g durante 5 min a + 4 °C. El líquido sobrenadante resultante (PNS) se retuvo. Se añadió 1 ml de tampón de homogeneización al sedimento nuclear y se volvió a centrifugar a 1000 x g durante 5 min. Las dos fracciones anteriores se mezclaron y se centrifugaron a 3000 x g durante 10 min a + 4 °C. El líquido sobrenadante de 3000 x g se estratificó sobre 2 ml de almohadilla de sacarosa al 60 % en tubo SW40 o SW60 y se centrifugó a 100.000 x g durante 45 minutos con aceleración y desaceleración lentas. La membrana plasmática bruta era evidente como una capa discreta en la parte superior de la almohadilla de sacarosa. La capa superior se separó (citósol) y la membrana plasmática se recogió usando una pipeta pasteur. El % de sacarosa de la fracción de membrana plasmática bruta se determinó usando un refractómetro. La preparación de membrana se diluyó con tampón HEPES para reducir el contenido de sacarosa por debajo de 15 %. La preparación de membrana plasmática bruta se estratificó en gradiente de sacarosa de 15 a 60 % preformado en tubo SW40 y se centrifugó a 100.000 x g durante 17 horas con aceleración y desaceleración lentas. El gradiente de sacarosa se fraccionó usando el descargador de gradiente (velocidad 0,5, distancia 2,5, fracciones 35). Se midió el contenido de proteína de todas las fracciones y se separaron en un gel ID de acrilamida al 4 – 20 % (Novex) y se sometieron a transferencia Western con anticuerpos contra el receptor de transferrina, oxidoreductasa II y calnexina.

Preparación de fracciones de la membrana plasmática para análisis en gel 1D

45 Se identificaron las fracciones de membrana plasmática que presentaban inmunorreactividad frente a la transferrina, pero sin inmunorreactividad frente a la oxidoreductasa II ni calnexina. Las fracciones de sacarosa se mezclaron y se diluyeron al menos cuatro veces con HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, vanadato 1 mM, azida al 0,02 %. La fracción de sacarosa diluida se añadió a un tubo SW40 o SW60 y se centrifugó a 100.000 x g durante 45 min con aceleración y desaceleración lentas. El líquido sobrenadante se separó del sedimento de membranas y el sedimento se lavó tres veces con PBS-CM. El sedimento de membranas se solubilizó en SDS al 2 % en TrisHCl 63 mM, pH 7,4. Se hizo un ensayo de proteínas y se añadieron mercaptoetanol (2 % final), glicerol (10 %) y se añadió azul de bromofenol (0,0025 % final). Se usó una concentración final de proteína de 1 µg/µl para la carga del gel 1D. La muestra de proteína extraída se solubilizó en tampón de lisis 1D y las proteínas se separaron por PAGE 1D (gradiente 8 – 16 %).

Espectrometría de masas

55 La proteína CD27L escindida del gel 1D se digirió con tripsina y se analizó por MALDI-TOF-MS (Voyager STR, Applied Biosystems) usando un láser de longitud de onda 337 nm para la desorción y el modo de análisis de espejo iónico. Las masas seleccionadas para CD27L ([M + H] = 1217,6 y 1695,8) se caracterizaron además por espectrometría de masas en tándem, usando un QTOF-MS equipado con un sistema de cromatografía de nanofluidos eluyendo directamente en el instrumento. Antes del análisis MALDI las muestras se desalaron y se concentraron usando C18 Zip Tips™ (Millipore).

65 Para la secuenciación parcial de aminoácidos e identificación de CD27L, se buscaron los espectros de masas en tándem no interpretados de péptidos tripticos usando el programa de búsqueda SEQUEST (Eng y col., 1994, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5 : 976 – 989), versión v.C.1. La base de datos de búsqueda era una base de datos construida con entradas de proteínas en la base de datos no redundante mantenida por el Centro Nacional para la Información

Biotecnológica (NCBI) que está accesible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Se encontraron secuencias de aminoácidos en tándem que se correspondían con la proteína CD27L (disponible con el número de acceso P32970 en la base de datos SwissProt, mantenida por el Instituto Suizo de Bioinformática, (<http://www.expasy.ch/>)) (Figura 1). La masa predicha de la proteína es 21,1 kDa y el peso molecular aparente medido en el gel es 23,7 kDa.

5

Ejemplo 2: Expresión del ARNm de CD27L en tejidos humanos

Los autores de la invención usaron la RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Heid y col. (1996) *Genome Res.* 6, 986 – 994; Morrison y col. (1998) *Biotechniques* 24 : 954 – 958) para analizar la distribución del ARNm de CD27L en tejidos humanos normales, líneas celulares de cáncer de riñón y tejidos clínicos de cáncer de riñón y de colon (figuras 2 – 4).

10

Preparación del ARN total y síntesis de la primera cadena de ADNc

El ARN total se preparó a partir de células cultivadas y muestras de tejido homogeneizado usando reactivo triazol (Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se volvió a suspender en agua exenta de ARN en una concentración de 1 µg/µl. Se sintetizó la primera cadena de ADNc a partir de 5 µg de ARN total usando la transcriptasa inversa Superscript II (Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada muestra de ADNc se purificó usando una minicolumna de purificación de PCR (Qiagen), se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm, y se diluyó a 10 ng/µl.

15

20

Cuantificación del ARNm de CD27L por RT-PCR

Se usó la RT-PCR en tiempo real para medir cuantitativamente la expresión de CD27L en los ARNm de tejido humano normal (Clontech), líneas de células de cáncer de riñón y tejidos de cáncer de riñón y de colon. Los cebadores usados para la PCR eran los siguientes:

25

sentido directo, 5' gctgctttggtcccattggtcg 3' (SEQ ID NO: 3)

30

sentido contrario, 5' gaggtcctgtgtgattcagctg 3' (SEQ ID NO: 4)

Las reacciones que contenían 10 ng de ADNc, preparado como se ha descrito antes, reactivos de detección de secuencias verde SYBR (PE Biosystems) y los cebadores de sentido directo y sentido contrario, se ensayaron en un sistema de detección de secuencias ABI7700 (PE Biosystems). Las condiciones de la PCR eran 1 ciclo a 50 °C durante 2 min, 1 ciclo a 95 °C durante 10 min, y 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 65 °C durante 1 min. La acumulación de producto de la PCR se midió en tiempo real como el aumento de la fluorescencia del verde SYBR, y los datos se analizaron usando el programa Sequence Detector v1.6.3 (PE Biosystems). Se generaron las curvas patrón que relacionan el número de copias de molde inicial con la fluorescencia y el ciclo de amplificación, usando el producto de la PCR amplificado como molde, y se usaron para calcular el número de copias de CD27L en cada muestra.

35

40

Como se muestra en la figura 2, la distribución del ARNm de CD27L era baja en tejidos normales, con los niveles más altos de expresión en el timo, amígdala y nódulos linfáticos (147 – 200 copias.ng⁻¹ de ADNc), y se detectaron niveles solo bajos de ARN mensajero de CD27L en otros tejidos normales. El ARNm de CD27L se detectó en la línea celular de cáncer de riñón HEK 293 (190 copias.ng⁻¹ de ADNc) y era expresado con mucho exceso en la línea celular de tumor de Wilms (cáncer de riñón en niños, véase antes) (9200 copias.ng⁻¹ de ADNc).

45

La figura 3 muestra los niveles de expresión de CD27L en 3 parejas de colon normal / tumoral correspondientes, junto con la expresión en el colon normal. Los niveles de expresión están aumentados en todas las parejas de muestras, entre 7 y 30 veces.

50

La figura 4 muestra el nivel de expresión de CD27L en siete tumores de riñón, así como en tejidos de riñón normal y en dos parejas correspondientes de tejidos de riñón tumoral y normal. Se observa expresión elevada en la mayoría de las muestras de tumor, con niveles en dos muestras por encima de 3000 copias.ng⁻¹ de ADNc.

55

Ejemplo 3 - La expresión relativa de CD27L se calculó por citometría de flujo usando un anticuerpo dirigido contra CD27L marcado con FITC

El anticuerpo dirigido contra CD27L directamente conjugado se obtuvo de Ancell Corp (Bayport, EE.UU.). Este anticuerpo IgG1 (denominado BU69) se obtuvo por inmunización de ratones con la línea celular WM-1 (macroglulinemia de Waldenstrom). El epítipo de unión no se ha identificado, sin embargo, se ha mostrado que este anticuerpo inhibe la proliferación de linfocitos T inducida por células dendríticas y por lo tanto se puede ver como "neutralizante" (véase *Leukocyte Typing V*, S.F. Schlossman, y col., eds. Oxford University Press, Oxford, (1995) pág. 1137 – 1138). El control de isótopos usado era un anticuerpo IgGk1 marcado con FITC obtenido de Serotec Ltd. (Kidlington, Reino Unido). Las siguientes líneas de linfocitos B: BL16, BL32, BL58, BL115, AS283 y KHM10B fueron proporcionadas por el Prof. Martin Dyer (University of Leicester) mientras que la línea MUTU-III fue

60

65

proporcionada por el Dr. Noemi Nagy (Karolinska Institute, Suecia). Todas las demás líneas se adquirieron en ECACC o ATCC.

5 Se recogieron las líneas celulares adherentes usando disolución de disociación no enzimática estándar (Sigma). Las células en suspensión se recogieron eliminando una cantidad adecuada de medio de cultivo del matraz. Para la preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC); las preparaciones de capa leucocitaria se obtuvieron del servicio nacional de sangre (NBS - John Radcliffe branch, Oxford, Reino Unido) en los términos del acuerdo 0211/T464. Las suspensiones celulares puras posteriormente se purificaron por centrifugación en gradientes de Ficoll (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después, se redujeron las plaquetas de las suspensiones de células PBMC mediante 4 ciclos de centrifugación a baja velocidad. Todas las líneas celulares (PBMC adherentes, en suspensión y de voluntarios primarios) después se lavaron otra vez en DPBS, se contaron usando un hemocitómetro y se volvieron a suspender con 5 millones de células.ml⁻¹.

15 *Protocolo de citometría de flujo*

Para todas las células a analizar, se añadió una parte alícuota de 100 µl de células (5 x 10⁵ células) a cada pocillo en una placa de 96 pocillos. Después las células se sedimentaron por centrifugación a 2 krmp durante 5 min y cada sedimento se volvió a suspender en 40 µl de DPBS complementado con BSA al 0,5 %. Después la placa se incubó a 4 grados durante 20 min para permitir el bloqueo de los sitios de unión hidrófobos en la superficie celular. Después de la incubación, se añadieron 10 µl de anticuerpo dirigido contra CD27L que se había diluido previamente 1/10 a partir de la mezcla madre original usando DPBS (originalmente 1 µl por ensayo, aquí usando 10 µl por ensayo). Para todas las células se preparó una muestra adicional en paralelo, en la que el anticuerpo dirigido contra CD27L se sustituyó por una parte alícuota de 10 µl de anticuerpo de control de isotipo IgG1k FITC (Serotec Ltd.). Después, las células marcadas con anticuerpo se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, con mezclado intermitente (cada 15 min). Después de incubación, las células se lavaron 3 veces en DPBS estándar y se pusieron en tubos FACS de poliestireno [Elkay Ltd.]. Todas las adquisiciones de la citometría de flujo se hicieron usando un citómetro de flujo EPICS XL [Coulter Corp.]. Se detectó la fluorescencia celular en FL1, se separaron los agregados celulares del análisis por activación de puertas FSC/SSC. Para el análisis de datos, se restó el [log] de la intensidad de fluorescencia media de la muestra de control de isotipo del [log] de las intensidades de fluorescencia medias para la misma línea celular. Este valor, denominado "fluorescencia corregida de isotipo" después se representó gráficamente para cada línea celular o muestra de sangre periférica y se presentó en forma de un diagrama de barras. Los errores típicos que no superaban +/- 10 % se vieron como aceptables para estos experimentos.

35 *Resultados*

Se encontró que todas las líneas de células de riñón ensayadas expresaban un nivel significativo de CD27L. Para dos líneas celulares (A 498 y 786-0) esta fluorescencia era la más alta vista en el panel entero de líneas celulares. Entre las líneas de linfocitos B ensayadas había una variabilidad considerable en los niveles de CD27L detectados, con algunas células que no expresaban en absoluto. También se mostró que la línea de riñón embrionario humano HEK-293 era negativa, así como lo era la línea celular CHO, incluida como un control negativo. También se encontró que una línea celular derivada de linfocitos T (Jurkat), una línea de leucemia mieloide (K562) y las dos líneas celulares monocíticas (U937 y THP-1), eran negativas para CD27L. Con respecto a los subgrupos de sangre periférica, para los 4 voluntarios, se encontró que los subconjuntos tanto CD3 + [linfocitos T] como CD19 + (linfocitos B) eran negativos para CD27L.

45 Por lo tanto, las líneas celulares de riñón tienen una expresión de CD27L considerablemente más alta que los linfocitos T y B de la sangre periférica. La expresión de CD27L se puede detectar en una proporción alta de tumores malignos de linfocitos B pero no en líneas mieloides. Estos descubrimientos sugieren que un potencial anticuerpo terapéutico liberado en la circulación no será secuestrado por linfocitos B/T que expresan CD27L. Por lo tanto, lo más probable es que la expresión de CD27L esté restringida a células activadas en el tejido linfoide, es decir, nódulos linfáticos, bazo, amígdala, etc.

55 Ejemplo 4 - Resumen: unión de un anticuerpo dirigido contra CD27L a un panel de líneas celulares de tumor de riñón

El anticuerpo dirigido contra CD27L directamente conjugado se obtuvo de Ansell Corp (Bayport, EE.UU.) como se ha descrito antes.

60 Las líneas celulares se recogieron por digestión con tripsina y se volvieron a sembrar en portaobjetos de cámara. Después de 24 h de incubación, las cámaras se lavaron tres veces en PBS se volvieron a suspender en formaldehído al 5 % para la fijación. Después de 5 minutos de la fijación, las células se volvieron a lavar 3 veces en DPBS y se bloquearon en DPBS complementado con FBS al 5 %. Las células se dejaron bloquear durante 60 min para prevenir la unión no específica de anticuerpo a las células. Después, se añadió el anticuerpo primario conjugado con FITC (dirigido contra CD27L o control isotipo IgG1) (1 µg/ml en 200 µl de DPBS-FBS 5 %) y los portaobjetos de cámara se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron dos

veces en DPBS/5 % y una vez en DPBS solo, dejando al menos 5 min entre cada etapa de lavado. Los portaobjetos después se montaron en medio de montaje acuoso y se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia DMRIE2 (Leica AG).

5 Para las 4 líneas tumorales de riñón había algún elemento de reactividad con el anticuerpo dirigido contra CD27L-FITC. La tinción de CD27L más fuerte se observó en células A498. Ninguna de las líneas (células CHO y HEK-293) logró mostrar ninguna fluorescencia específica cuando se incubó con anticuerpo dirigido contra CD27L. Se observó una señal insignificante después de incubación de todas las líneas celulares con el anticuerpo de control IgG1k-FITC.

10 Por lo tanto, la expresión de CD27L se puede detectar en todas las líneas tumorales de riñón ensayadas, pero no se encontró en la línea de riñón embrionario HEK-293 ni en la línea CHO de control.

LISTA DE SECUENCIAS

15 < 110 > Terrett, Jonathan Alexander

Oxford GlycoSciences (UK) Ltd.

20 < 120 > Procedimientos de diagnóstico y el tratamiento de cánceres derivados de células epiteliales

< 130 > P0134-WO01

25 < 150 > US 60/333.436

< 151 > 2001-11-27

< 160 > 4

30 < 170 > FastSEQ para Windows Versión 4.0

< 210 > 1

35 < 211 > 926

< 212 > ADN

< 213 > homo sapiens

40 < 400 > 1

```

ccagagaggg gcaggcttgt cccctgacag gttgaagcaa gtagacgccc aggagccccg 60
ggaggggggct gcagtttctt tccttccttc tcggcagcgc tccgcgcccc catcgcccct 120
cctgcgctag cggaggtgat cgccgcggcg atgccggagg agggttcggg ctgctcgggtg 180
cggcgcaggg cctatgggtg cgtcctgctg gctgctttgg tcccattggt cgcgggcttg 240
gtgatctgcc tcgtggtgtg catccagcgc ttcgcacagg ctcagcagca gctgccgctc 300
gagtcaactg ggtgggacgt agctgagctg cagctgaatc acacaggacc tcagcaggac 360
cccaggctat actggcaggg gggcccagca ctgggcccgt ccttctctgca tggaccagag 420
ctggacaagg ggcagctacg tatccatcgt gatggcatct acatggtaca catccagggtg 480
acgctggcca tctgetcctc cacgacggcc tccaggcacc accccaccac cctggccgtg 540
ggaatctgct ctcccgcctc ccgtagcatc agcctgctgc gtctcagctt ccaccaaggt 600
tgtaccattg tctcccagcg cctgacgccc ctggcccagag gggacacact ctgcaccaac 660
ctcactggga cacttttgcc ttcccgaaac actgatgaga ctttctttgg agtgcagtgg 720
gtgcgcccct gaccactgct gctgattagg gttttttaa ttttatttta ttttatttaa 780
gttcaagaga aaaagtgtac acacaggggc caccgggggt tggggtgggg gtgtggtggg 840
gggtagtttg tggcaggaca agagaaggca ttgagctttt tctttcattt tcctattaaa 900
aaatacaaaa atcaaaacaa aaaaaa 926

```

ES 2 394 018 T3

< 210 > 2

< 211 > 193

5

< 212 > PRT

< 213 > homo sapiens

10 < 400 > 2

```

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

Pro
    
```

< 210 > 3

15

< 211 > 22

< 212 > ADN

20 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > cebador

25

< 400 > 3

gctgctttgg tcccattggt cg

22

ES 2 394 018 T3

< 210 > 4

< 211 > 22

5

< 212 > ADN

< 213 > Secuencia artificial

10

< 220 >

< 223 > cebador

< 400 > 4

15

gaggtcctgt gtcattcagc tg

22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de cribado y/o diagnóstico de cáncer de células renales en un sujeto, y/o de seguimiento de la eficacia de la terapia de cáncer de células renales, que comprende la etapa de detección y/o cuantificación, en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, de un polipéptido CD27L que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID NO: 2); en el que dicha etapa comprende el uso de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido CD27L.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el nivel de dicho polipéptido se compara con un intervalo de referencia o control previamente determinado.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la etapa de detección comprende:
- 15 (a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo como se define en la reivindicación 1, y
- (b) detectar si se ha producido unión entre el anticuerpo y dicho polipéptido en la muestra.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la etapa (b) comprende la detección del polipéptido capturado usando un reactivo de detección marcado directa o indirectamente.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en el que el anticuerpo se inmoviliza en una fase sólida.
- 25 6. El uso de un anticuerpo que se une específicamente a CD27L en la fabricación de una composición para el tratamiento del cáncer de células renales, estando dicho anticuerpo conjugado con un agente terapéutico o resto de fármaco.
7. Un anticuerpo que se une específicamente a CD27L para usar en el tratamiento del cáncer de células renales, estando dicho anticuerpo conjugado con un agente terapéutico o resto de fármaco.
- 30 8. El uso según la reivindicación 6 o el anticuerpo según la reivindicación 7, en el que el resto de fármaco es una toxina.
- 35 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o el uso de acuerdo con la reivindicación 6 o el anticuerpo según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado o biespecífico, o un fragmento de unión al epítipo de cualquiera de los mismos.

Figura 2

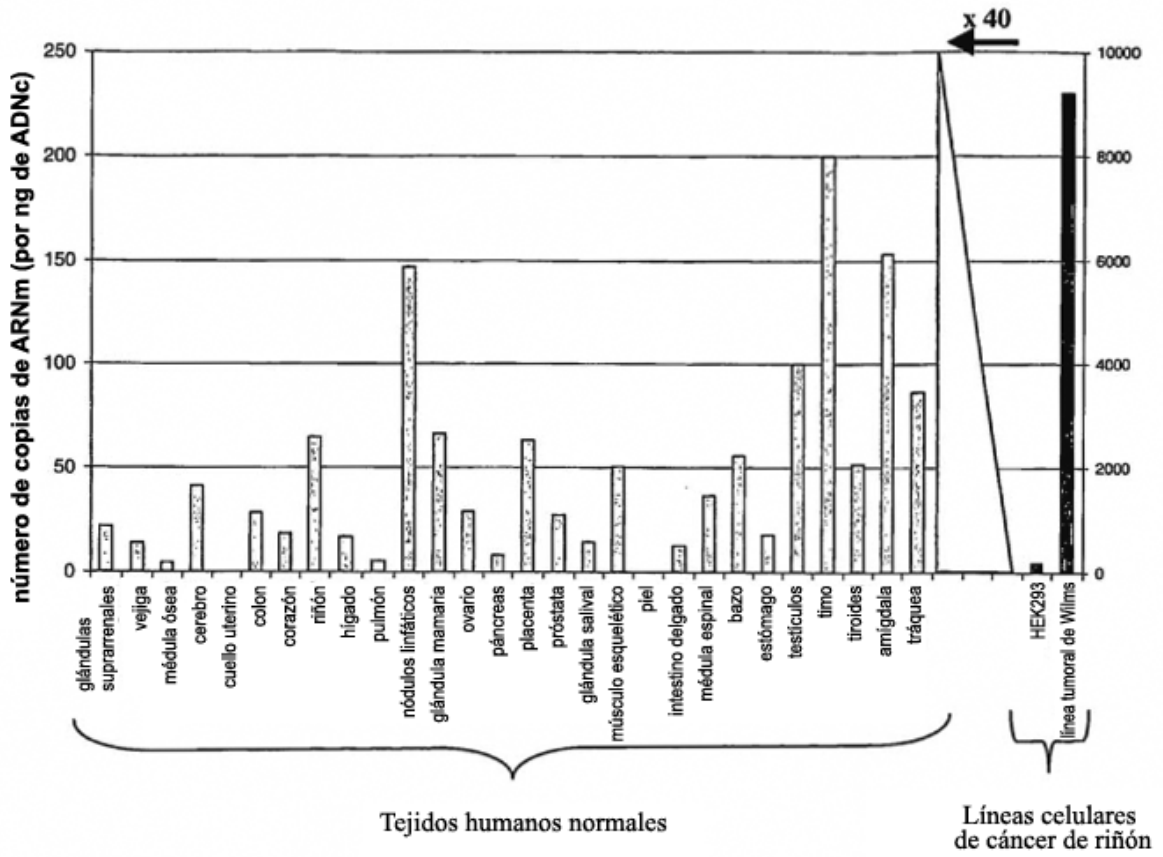


Figura 3

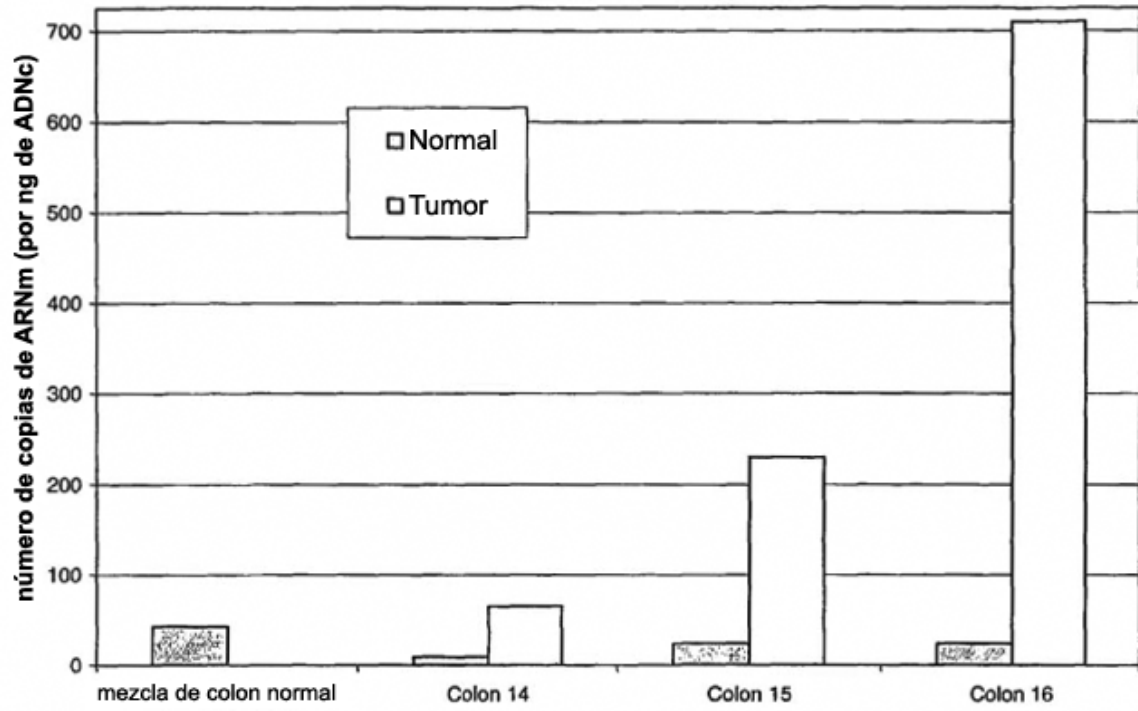


Figura 4

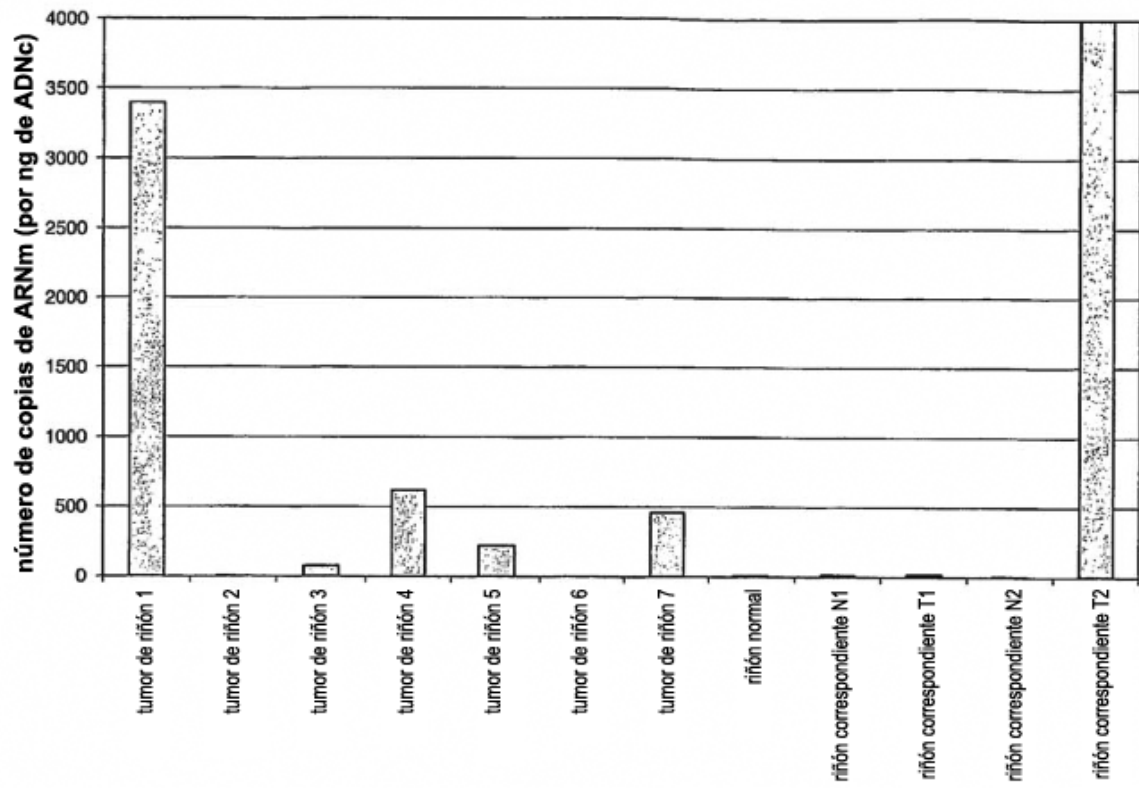


Figura 5

