

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 445**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06759514 .0**
96 Fecha de presentación: **10.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1888624**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE LIGANDO APO-2/TRAIL UTILIZANDO CRISTALIZACIÓN EN FRÍO.**

30 Prioridad:
24.05.2005 US 136842

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2011

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:
FLORES, Heather; LIN, Tanya, P.;
MATTHEWS, Timothy, C.; PAI, Roger y
SHAHROKH, Zahra

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 368 445 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de purificación de ligando apo-2/trail utilizando cristalización en frío

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere en general a la purificación de Apo2L/TRAIL que implica cristalización.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0002] Se han identificado diversas moléculas, tales como el factor de necrosis tumoral-alfa ("TNF-alfa"), el factor de necrosis tumoral-beta ("TNF-beta" o "linfotóxina-alfa"), la linfotóxina-beta ("LT-beta"), el ligando CD30, el ligando CD27, el ligando CD40, el ligando OX-40, el ligando 4-1BB, el ligando de Apo-1 (también denominado como ligando Fas o ligando CD95), el ligando de Apo-2 (también denominado como Apo2L o TRAIL), el ligando de Apo-3 (también denominado TWEAK), el APRIL, el ligando OPG (también denominado como ligando RANK, ODF o TRANCE), y el TALL-1 (también denominado BlyS, BAFF o THANK), como miembros de la familia de citocinas del factor de necrosis tumoral ("TNF") (Véase, por ejemplo, Gruss y Dower, Blood, 85:3378-3404 (1995); Schmid *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 83:1881 (1986); Dealtry *et al.*, Eur. J. Immunol., 17:689 (1987); Pitti *et al.*, J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, Immunity, 3:673-682 (1995); Browning *et al.*, Cell, 72:847-856 (1993); Armitage *et al.*, Nature, 357:80-82 (1992), WO 97/01633 publicada el 16 de enero de 1997; WO 97/25428 publicada el 17 de julio de 1997; Marsters *et al.*, Curr. Biol., 8:525-528 (1998); Chicheportiche *et al.*, Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997); Hahne *et al.*, J. Exp. Med., 188: 1185-1190 (1998); WO98/28426 publicada el 2 de julio de 1998; WO98/46751 publicada el 22 de octubre de 1998; WO98/18921 publicada el 7 de mayo de 1998; Moore *et al.*, Science, 285:260-263 (1999); Shu *et al.*, J. Leukocyte Biol., 65:680 (1999); Schneider *et al.*, J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999)). De entre estas moléculas, se ha publicado que TNF-alfa, TNF-beta, el ligando CD30, el ligando 4-1BB, el ligando Apo-1, el ligando Apo-2 (Apo2L/TRAIL) y el ligando Apo-3 (TWEAK) están implicadas en la muerte celular apoptótica.

30 [0003] Apo2L/TRAIL se identificó hace varios años como un miembro de la familia de citocinas del TNF. (véase, por ejemplo, Wiley *et al.*, Immunity, 3:673-682 (1995); Pitti *et al.*, J. Biol. Chem., 271:12697-12690 (1996)). El polipéptido Apo2L/TRAIL humano de longitud completa es una proteína transmembrana de Tipo II de 281 aminoácidos de longitud. Algunas células pueden producir una forma soluble nativa del polipéptido, a través del corte enzimático de la región extracelular del polipéptido (Mariani *et al.*, J. Cell. Biol., 137:221-229 (1997)). Los estudios cristalográficos de las formas solubles del Apo2L/TRAIL revelan una estructura homotrímica similar a las estructuras del TNF y de otras proteínas relacionadas (Hymowitz *et al.*, Molec. Cell, 4:563-571 (1999); Hymowitz *et al.*, Biochemistry, 39:633-644 (2000)). Sin embargo, se halló que el Apo2L/TRAIL, a diferencia de otros miembros de la familia del TNF, tiene una característica estructural única, ya que tres residuos de cisteína (en la posición 230 de cada subunidad en el homotrímico) se coordinan conjuntamente con un átomo de zinc, y la unión al zinc es importante para la estabilidad del trímero y su actividad biológica. (Hymowitz *et al.*, ver más arriba; Bodmer *et al.*, J. Biol. Chem., 275:20632-20637 (2000)). Cha *et al.*, Immunity, 11: 253-261, 199 describe una estructura cristal de TRAIL humano de una resolución de 2,8 Å.

45 [0004] Se ha publicado en la literatura que Apo2L/TRAIL puede desempeñar un papel en la modulación del sistema inmune, incluyendo las enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide, y en el tratamiento del VIH (véase, por ejemplo, Thomas *et al.*, J. Immunol., 161:2195-2200 (1998); Johnsen *et al.*, Cytokine, 11:664-672 (1999); Griffith *et al.*, J. Exp. Med., 189:1343-1353 (1999); Song *et al.*, J. Exp. Med., 191:1095-1103 (2000); Jeremias *et al.*, Eur. J. Immunol., 28:143-152 (1998); Katsikis *et al.*, J. Exp. Med., 186:1365-1372 (1997); Miura *et al.*, J. Exp. Med., 193:651-660 (2001)).

50 [0005] Se ha publicado también que las formas solubles del Apo2L/TRAIL inducen la apoptosis en una variedad de células cancerosas *in vitro*, incluyendo de tumores de colon, pulmón, mama, próstata, vejiga urinaria, riñón, ovario y cerebro, así como de melanomas, leucemias y mieloma múltiple (véase, por ejemplo, Wiley *et al.*, ver más arriba; Pitti *et al.*, ver más arriba; Rieger *et al.*, FEBS Letters, 427:124-128 (1998); Ashkenazi *et al.*, J. Clin. Invest., 104:155-162 (1999); Walczak *et al.*, Nature Med., 5:157-163 (1999); Keane *et al.*, Cancer Research, 59:734-741 (1999); Mizutani *et al.*, Clin. Cancer Res., 5:2605-2612 (1999); Gazitt, Leukemia, 13: 1817-1824 (1999); Yu *et al.*, Cancer Res., 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 97:1754-1759 (2000)). Los estudios *in vivo* en modelos de tumor murino sugieren adicionalmente que el Apo2L/TRAIL, solo o en combinación con la quimioterapia o la terapia con radiación, puede ejercer efectos anti-tumorales sustanciales (véase, por ejemplo, Ashkenazi *et al.*, ver más arriba; Walczak *et al.*, ver más arriba; Glianiak *et al.*, Cancer Res., 59:6153-6158 (1999); Chinnaiyan *et al.*, ver más arriba; Roth *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 265:1999 (1999)). A diferencia de muchos tipos de células cancerosas, la mayoría de los tipos de células humanas normales parecen ser resistentes a la inducción de apoptosis por ciertas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi *et al.*, ver más arriba; Walczak *et al.*, ver más arriba). Jo *et al.*, han descrito que una forma soluble de Apo2L/TRAIL, marcada con polihistidina, indujo *in vitro* la apoptosis en hepatocitos humanos aislados, pero no en hepatocitos no humanos (Jo *et al.*, Nature Med., 6:564-567 (2000); véase también, Nagata, Nature Med., 6:502-503 (2000)). Se cree que ciertas preparaciones de Apo2L/TRAIL recombinante pueden variar en términos de propiedades bioquímicas y actividades biológicas sobre

células normales respecto a las enfermas, dependiendo, por ejemplo, de la presencia o ausencia de una molécula etiquetada, contenido de zinc, y % de contenido de trimero. (Véase, Lawrence *et al.*, Nature Med., Carta al Editor, 7:383-385 (2001); Qin *et al.*, Nature Med., Carta al Editor, 7:385-386 (2001)).

5 **[0006]** Se cree que la inducción de varias respuestas celulares, mediadas por tales citocinas de la familia del TNF, se inicia a partir de su unión a receptores celulares específicos. Previamente, se identificaron dos receptores distintos del TNF de aproximadamente 55-kDa (TNFR1) y 75-kDa (TNFR2) (Hohman *et al.*, J. Biol. Chem., 264:14927-14934 (1989); Brockhaus *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3127-3131 (1990); EP 417.563, publicada el 20 de marzo de 1991; Loetscher *et al.*, Cell, 61:351 (1990); Schall *et al.*, Cell, 61:361 (1990); Smith *et al.*, Science, 248:1019-1023 (1990); Lewis *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:2830-2834 (1991); Goodwin *et al.*, Mol. Cell. Biol., 11:3020-3026 (1991)). Se halló que esos TNFR compartían la estructura típica de los receptores de superficie celular, incluyendo las regiones extracelular, transmembrana e intracelular. Las partes extracelulares de ambos receptores también se hallaron forma natural como proteínas de unión a TNF solubles (Nophar, Y. *et al.*, EMBO J., 9:3269 (1990); y Kohno, T. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:8331 (1990); Hale *et al.*, J. Cell. Biochem. Suplemento 15F, 1991, p. 113 (P424)).

20 **[0007]** La parte extracelular de los TNFR del tipo 1 y tipo 2 (TNFR1 y TNFR2) contiene un patrón de secuencia de aminoácidos repetitivos de cuatro dominios ricos en cisteínas (CRD) denominados del 1 al 4, que empiezan a partir del extremo NH₂-terminal. (Schall *et al.*, ver más arriba; Loetscher *et al.*, ver más arriba; Smith *et al.*, ver más arriba; Nophar *et al.*, ver más arriba; Kohno *et al.*, ver más arriba; Banner *et al.*, Cell, 73:431-435 (1993)). Existe un patrón repetitivo de CDR similar en otras varias proteínas de la superficie celular, incluyendo el receptor del factor de crecimiento del nervio p75 (NGFR) (Johnson *et al.*, Cell, 47:545 (1986); Radeke *et al.*, Nature, 325:593 (1987)), el antígeno CD40 de la célula B (Stamenkovic *et al.*, EMBO J., 8:1403 (1989)), el antígeno OX40 de la célula T (Mallet *et al.*, EMBO J., 9:1063 (1990)) y el antígeno Fas (Yonehara *et al.*, ver más arriba e Itoh *et al.*, Cell, 66:233-243 (1991)). Los CDR también se hallan en las proteínas solubles T2 similares al TNFR (sTNFR) de los virus de la viruela de Shope y mixoma (Upton *et al.*, Virology, 160:20-29 (1987); Smith *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 176:335 (1991); Upton *et al.*, Virology, 184:370 (1991)). El alineamiento óptimo de estas secuencias indica que las posiciones de los residuos cisteína están bien conservadas. A estos receptores a menudo se les denomina de forma conjunta como miembros de la superfamilia del receptor de TNF/NGF.

30 **[0008]** Los ligandos de la familia del TNF identificados hasta la fecha, con excepción de la linfotóxina-beta, son habitualmente proteínas transmembrana del tipo II, cuyo extremo C-terminal es extracelular. Por contra, la mayoría de los receptores en la familia del receptor del TNF (TNFR) identificados hasta la fecha son habitualmente proteínas transmembrana del tipo I. Sin embargo, en ambas familias del ligando y del receptor del TNF, la homología identificada entre los miembros de la familia se ha hallado principalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Varias de las citocinas de la familia del TNF, incluyendo el TNF-alfa, el ligando Apo-1 y el ligando CD40, son cortadas proteolíticamente a nivel de la superficie celular; la proteína resultante en cada caso forma habitualmente una molécula homotrimérica que funciona como una citocina soluble. Las proteínas de la familia del receptor del TNF también son cortadas proteolíticamente de forma habitual para liberar ECD solubles del receptor que pueden funcionar como inhibidores de las citocinas afines.

35 **[0009]** Pan *et al.*, han descrito otro miembro de la familia del receptor del TNF denominado como "DR4" (Pan *et al.*, Science, 276:111-113 (1997); ver también la WO98/32856 publicada el 30 de julio de 1998). Se describió que el DR4 contenía un dominio de muerte citoplasmático capaz de involucrar el aparato de suicidio de la célula. Pan *et al.*, describen que se cree que el DR4 es un receptor para el ligando conocido como Apo2L/TRAIL.

40 **[0010]** En Sheridan *et al.*, Science, 277:818-821 (1997) y Pan *et al.*, Science, 277:815-818 (1997), se describe otra molécula que se cree que es un receptor para el Apo2L/TRAIL (ver también la WO98/51793 publicada el 19 de noviembre de 1998; la WO98/41629 publicada el 24 de septiembre de 1998). Esa molécula se denomina como DR5 (también se ha denominado alternativamente como Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER (Screaton *et al.*, Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, Nature Genetics, 17:141-143 (1997); WO98/35986, publicada el 20 de agosto 1998; EP 870.827, publicada el 14 de octubre de 1998; WO98/46643, publicada el 22 de octubre de 1998; WO99/02653 publicada el 21 de enero de 1999; WO99/09165, publicada el 25 de febrero de 1999; WO99/11791, publicada el 11 de marzo de 1999). Se ha informado que el DR5, al igual que el DR4, contiene un dominio de muerte citoplasmático y que es capaz de señalar la apoptosis. La estructura del cristal del complejo formado entre Apo-2L/TRAIL y DR5 se describe en Hymowitz *et al.*, Molecular Cell, 4:563-571 (1999).

50 **[0011]** Un grupo adicional de receptores recientemente identificados se denomina como "receptores de señuelo", los cuales se cree que funcionan como inhibidores, en vez de como transductores de señal. Este grupo incluye el DCR1 (también denominado como TRID, LIT o TRAIL-R3) (Pan *et al.*, Science, 276:111-113 (1997); Sheridan *et al.*, Science, 277:818-821 (1997); McFarlane *et al.*, J. Biol. Chem., 272:25417-25420 (1997); Schneider *et al.*, FEBS Letters, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti *et al.*, J. Exp. Med., 186:1165-1170 (1997); y Mongkolsapaya *et al.*, J. Immunol., 160:3-6 (1998)) y el DCR2 (también denominado TRUND o TRAIL-R4) (Marsters *et al.*, Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997); Pan *et al.*, FEBS Letters, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti *et al.*, Immununity, 7:813-820 (1997)), siendo ambas moléculas de la superficie celular, así como el OPG (Simonet *et al.*, ver más arriba; Emery *et al.*, ver

más abajo) y el DCR3 (Pitti *et al.*, *Nature*, 396:699-703 (1998)), siendo ambas proteínas solubles, secretadas. Se ha descrito que Apo2L/TRAIL se une a aquellos receptores denominados como DcR1, DcR2 y OPG.

[0012] Se cree que Apo2L/TRAIL actúa a través de los "receptores de muerte" de la superficie celular DR4 y DR5 para activar las caspasas, o enzimas que llevan a cabo el programa de muerte celular. Después de la unión del ligando, tanto DR4 como DR5 pueden activar la apoptosis independientemente mediante el reclutamiento y activación del iniciador de la apoptosis, la caspasa-8, a través de la molécula adaptadora que contiene el dominio de muerte denominado como FADD/Mort1 (Kischkel *et al.*, *Immunity*, 12:611-620 (2000); Sprick *et al.*, *Immunity*, 12:599-609 (2000); Bodmer *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2:241-243 (2000)). A diferencia de DR4 y DR5, los receptores DcR1 y DcR2 no dan la señal de la apoptosis.

[0013] Para una revisión de la familia de citocinas del TNF y sus receptores, véase Ashkenazi y Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi y Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:255-260 (2000); Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997); Gruss y Dower, ver más arriba; Nagata, *Cell*, 88:355-365 (1997); Locksley *et al.*, *Cell*, 104:487-501 (2001).

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0014] Ciertas proteínas, tales como Apo2L/TRAIL y otros miembros de la familia de citocinas de TNF, muestran actividad biológica cuando la proteína está en un trimero o en forma trimérica. De este modo, para los objetivos de uso terapéutico o incluso de diagnóstico, se desean formulaciones de dichas proteínas en las que la proteína es estable y permanece biológicamente activa, particularmente estable en forma trimérica.

[0015] Los solicitantes descubrieron sorprendentemente que la estructura molecular única de APO2L/TRAIL, bajo ciertas condiciones, permite que cristalice espontáneamente. Esta propiedad permitió el desarrollo de un proceso de recuperación/purificación eficiente y escalable para APO2L/TRAIL que utiliza la cristalización como etapa de purificación. Además, la experiencia obtenida con APO2L/TRAIL permitió el desarrollo de un proceso de recuperación y purificación que implica la cristalización que se puede utilizar para proteínas capaces de la cristalización en general.

[0016] En un aspecto, la presente invención se refiere a un método de recuperación de Apo2L/TRAIL a partir de una mezcla que comprende

- (a) cargar la mezcla en una columna de intercambio catiónico;
- (b) lavar la columna de intercambio catiónico con un tampón de equilibrio, mediante el cual se eliminan los componentes no unidos presentes en la mezcla;
- (c) eluir el Apo2L/TRAIL unido a la columna de intercambio catiónico con un tampón de elución;
- (d) enfriar gradualmente el eluato hasta una temperatura de aproximadamente 2 a 4°C utilizando una velocidad de enfriamiento no lineal para mantener un nivel de supersaturación constante a medida que progresa la cristalización, mediante lo cual el Apo2L/TRAIL precipita espontáneamente en una forma cristalina para producir una mezcla de aguas madre y cristales de Apo2L/TRAIL, y
- (e) recuperar Apo2L/TRAIL de la mezcla obtenida en la etapa (d) en una pureza de por lo menos aproximadamente el 99%.

[0017] En una realización particular, la mezcla cargada en la columna de intercambio catiónico es un medio de cultivo o lisato celular de células productoras de Apo2L/TRAIL.

[0018] En otra realización, la mezcla es el lisato celular de células huésped de *E. coli* productoras de Apo2L/TRAIL.

[0019] En otra realización, el lisato se aclara antes de cargarse en la columna de intercambio catiónico.

[0020] En una realización adicional, el eluato obtenido en la etapa (c) se somete a la etapa de cristalización de (d) sin purificación adicional.

[0021] La columna de intercambio catiónico puede ser, por ejemplo, una columna SP-Sefarosa.

[0022] En una realización adicional, el pH de la mezcla cargada en la columna de intercambio catiónico (por ejemplo, SP-Sefarosa) es o se ajusta a aproximadamente 7,5. La elución de Apo2L/TRAIL se puede realizar, por ejemplo, en un tampón de elución que comprende NaCl 100-200 mM o Na₂SO₄ 100-150 mM en un tampón que ajusta el pH a 7,5-7,8.

[0023] En realizaciones adicionales, en la etapa (d) el eluato se enfría desde una temperatura de aproximadamente 15 a 30 °C hasta una temperatura de aproximadamente 2 a 8°C en aproximadamente 1 a 60 horas, o hasta una temperatura de aproximadamente 2 a 8 °C en aproximadamente 1 a 8 horas, o hasta una temperatura de aproximadamente 2 a 8 °C en aproximadamente 1 hora, o hasta una temperatura de aproximadamente 4°C en aproximadamente 1 hora.

[0024] En otra realización, el pH del eluato es o se ajusta a pH 7,0-8,0, tal como pH 7,3, antes de la cristalización.

[0025] En otra realización, el pH del eluato es o se ajusta a aproximadamente 7,5-8,0 después de la cristalización.

[0026] En una realización adicional, en la etapa (d) la temperatura de aproximadamente 2 a 4°C se mantiene hasta que se consigue o casi se consigue la solubilidad de equilibrio de Apo2L/TRAIL.

[0027] En el transcurso de la realización del método de la invención, en la etapa (d), se puede disminuir la solubilidad de Apo2L/TRAIL mediante la adición de un antisolvente, tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), MPD, etanol, isopropanol, y/o dioxano.

[0028] De este modo, por ejemplo, se utiliza como antisolvente PEG que tiene un peso molecular del PEG entre aproximadamente 400 y aproximadamente 10.000 daltons. En otras realizaciones representativas, el peso molecular de PEG es 400, 3.350 ó 10,000 daltons.

[0029] En una realización adicional, en la etapa (e) se recupera Apo2L/TRAIL en forma de cristales separados de las aguas madre mediante filtración o centrifugación o una combinación de los mismos. El pH de las aguas madre se puede ajustar a aproximadamente 8,0 antes de la filtración para disminuir la solubilidad.

[0030] En un aspecto adicional, el método de recuperación/purificación de la presente invención comprende además las etapas de disolver los cristales de Apo2L/TRAIL obtenidos en la etapa (d) del método descrito anteriormente, y someter la solución obtenida a una segunda etapa de purificación cromatográfica.

[0031] En una realización, la segunda etapa de purificación cromatográfica es cromatografía por interacción hidrofóbica, que se puede realizar, por ejemplo, en una columna de Fenil-Sefarosa.

[0032] En otra realización, la segunda etapa de purificación cromatográfica es una cromatografía de intercambio catiónico realizada, por ejemplo, en una columna CM-Sefarosa o SP-Sefarosa.

[0033] En una realización adicional, el Apo2L/TRAIL se recupera y formula siguiendo la segunda etapa de purificación cromatográfica mediante ultrafiltración-diafiltración.

[0034] En realizaciones adicionales, la pureza de la proteína purificada es por lo menos de aproximadamente el 99,5% o por lo menos de aproximadamente el 99,9%.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0035]

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc del Apo-2L/TRAIL humano (SEC ID NO:2) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID NO:1). La "N" en la posición del nucleótido 447 (en la SEC ID NO: 2) se usa para indicar que la base del nucleótido puede ser una "T" o una "G".

La figura 2 muestra un gel de tinción en plata SDS-PAGE que ilustra la pureza de las preparaciones de Apo2L/TRAIL descritas.

La figura 3 muestra los efectos de varias sales sobre la cristalización de Apo2L/TRAIL.

La figura 4 muestra las distribuciones de tamaño del cristal en equilibrio para rampas lineales de temperatura entre 22°C y 2°C durante periodos de enfriamiento de 1, 4, 8, y 24 horas.

La figura 5 muestra el efecto de la adición de PEG en la solubilidad de APO2L/TRAIL: 5 días de agitación a 2-8 °C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A. Definiciones

[0036] "Miembro de la familia del TNF" se usa en un sentido amplio para referirse a varios polipéptidos que comparten cierta similitud con el factor de la necrosis tumoral (TNF) en cuanto a la estructura o función. Ciertas características estructurales y funcionales asociadas con la familia de polipéptidos del TNF son conocidas en el estado de la técnica, y se describen, por ejemplo, en la sección "Antecedentes de la Invención". Tales polipéptidos incluyen, pero no se limitan a los polipéptidos mencionados en la técnica como TNF-alfa, TNF-beta, ligando CD40, ligando CD30, ligando CD27, ligando OX-40, ligando 4-1BB, ligando de Apo-1 (denominado también como ligando Fas o ligando CD95), Apo-2L/TRAIL (también denominado como TRAIL), ligando de Apo-3 (denominado también como TWEAK), APRIL, ligando OPG (denominado también como ligando RANK, ODF, o TRANCE), y TALL-1

(denominado también como BlyS, BAFF or THANK) (véase, por ejemplo, Gruss y Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning *et al.*, *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage *et al.*, *Nature*, 357:80-82 (1992), publicaciones del PCT con nº WO 97/01633; y WO 97/25428; Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Chicheportiche *et al.*, *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Hahne *et al.*, *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); publicaciones del PCT con nº WO98/28426; WO98/46751; y WO98/18921; Moore *et al.*, *Science*, 285:260-263 (1999); Shu *et al.*, *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999)).

[0037] Los términos "Apo2L/TRAIL", "Apo-2L", y "TRAIL" se usan en la presente invención para referirse a una secuencia polipeptídica que incluye los residuos aminoácidos 114-281, ambos inclusive, 95-281, ambos inclusive, residuos 92-281, ambos inclusive, residuos 91-281, ambos inclusive, residuos 41-281, ambos inclusive, residuos 15-281, ambos inclusive, o residuos 1-281, ambos inclusive, de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID NO:1), así como de los fragmentos biológicamente activos y variantes por supresión, inserción o sustitución de las secuencias anteriores. En una realización, la secuencia polipeptídica comprende los residuos 114-281 de la figura 1 (SEC ID NO:1), y opcionalmente consiste en los residuos 114-281 de la figura 1 (SEC ID NO:1). Opcionalmente, la secuencia polipeptídica comprende los residuos 92-281 o los residuos 91-281 de la figura 1 (SEC ID NO:1). Los polipéptidos del Apo-2L pueden estar codificados por la secuencia de nucleótidos nativa mostrada en la figura 1 (SEC ID NO:2). Opcionalmente, el codón que codifica el residuo Pro119 (figura 1; SEC ID NO:2) puede ser "CCT" o "CCG". En otras realizaciones, los fragmentos o variantes son biológicamente activas y tienen al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente aproximadamente al menos el 90% de identidad de secuencia, y aún más preferiblemente, al menos el 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias Apo2L/TRAIL antes citadas. Opcionalmente, el polipéptido Apo2L/TRAIL está codificado por una secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia polinucleotídica codificante proporcionada en la figura 1 (SEC ID NO:2). La definición abarca las variantes por sustitución del Apo2L/TRAIL en las cuales al menos uno de sus aminoácidos nativos está sustituido por un residuo alanina. Las variantes concretas por sustitución del Apo2L/TRAIL incluyen aquéllas en las que al menos un aminoácido es sustituido por un residuo alanina. Estas variantes por sustitución incluyen las identificadas, por ejemplo, como "D203A"; "D218A" y "D269A." Esta nomenclatura se usa para identificar las variantes del Apo2L/TRAIL en las cuales los residuos ácido aspártico en las posiciones 203, 218 y/o 269 (usando la numeración mostrada en la figura 1 (SEC ID NO:1)) se sustituyen por residuos alanina. Opcionalmente, las variantes del Apo2L/TRAIL pueden comprender una o más de las sustituciones por alanina que se citan en la Tabla 1 de la solicitud del PCT publicada WO 01/00832. Las variantes por sustitución incluyen una o más de las sustituciones de residuos identificadas en la Tabla I de la WO 01/00832, publicada el 4 de enero de 2001. La definición también abarca una secuencia nativa del Apo2L/TRAIL aislada a partir de una fuente del Apo2L/TRAIL o preparada mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. El Apo2L/TRAIL de la invención incluye los polipéptidos mencionados como Apo2L/TRAIL o TRAIL descritos en las publicaciones del PCT con nº WO97/01633 y WO97/25428. Los términos "Apo2L/TRAIL" o "Apo2L" se usan para referirse de forma general a las formas del Apo2L/TRAIL, lo que incluye las formas monoméricas, diméricas o triméricas del polipéptido. Toda la numeración de los residuos aminoácidos a los que se hace referencia en la secuencia del Apo2L usa la numeración según la figura 1 (SEC ID NO:1), a menos que específicamente se indique lo contrario. Por ejemplo, "D203" o "Asp203" se refiere al residuo ácido aspártico en la posición 203 en la secuencia proporcionada en la figura 1 (SEC ID No:1).

[0038] El término "dominio extracelular del Apo2L/TRAIL" o "ECD del Apo2L/TRAIL" se refiere a una forma del Apo2L/TRAIL que carece esencialmente de los dominios transmembrana y citoplásmico. Normalmente, el ECD tendrá menos del 1% de tales dominios transmembrana y citoplásmicos, y, preferiblemente tendrá menos del 0,5% de tales dominios. Se entenderá que cualquier dominio o dominios transmembrana, identificados para los polipéptidos de la presente invención, se identifican siguiendo los criterios empleados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero lo más probable es que en no más de 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio tal como se identificó inicialmente. En las realizaciones preferidas, el ECD consistirá en una secuencia del dominio extracelular soluble del polipéptido que carece de los dominios transmembrana y citoplásmico o intracelular (y no está unida a la membrana). Se describen secuencias concretas del dominio extracelular del Apo-2L/TRAIL en las publicaciones del PCT con nº WO97/01633 y WO97/25428.

[0039] El término "monómero del Apo2L/TRAIL" o "monómero del Apo2L" se refiere a una cadena covalente de una secuencia del dominio extracelular del Apo2L.

[0040] El término "dímero del Apo2L/TRAIL" o "dímero del Apo2L" se refiere a dos monómeros del Apo2L unidos en un enlace covalente mediante un enlace disulfuro. El término, tal y como se utiliza en la presente invención, incluye los dímeros del Apo2L que permanecen libres y los dímeros del Apo2L que están dentro de formas triméricas del Apo2L (es decir, asociados con otro, un tercer monómero del Apo2L).

[0041] El término "trímero del Apo2L/TRAIL" o "trímero del Apo2L" se refiere a tres monómeros del Apo2L que están asociados de forma no covalente.

[0042] El término "agregado del Apo2L/TRAIL" se usa para referirse a formas oligoméricas superiores

autoasociadas del Apo2L/TRAIL, tales como los trímeros del Apo2L/TRAIL, los cuales forman, por ejemplo, formas hexaméricas y nanoméricas del Apo2L/TRAIL.

5 [0043] La determinación de la presencia y cantidad de monómero, dímero o trímero (u otros agregados) del Apo2L/TRAIL puede hacerse usando procedimientos y ensayos conocidos en el estado de la técnica (y usando materiales disponibles comercialmente), tales como la HPLC por exclusión de tamaño nativo ("SEC"), la exclusión por tamaño de desnaturalización usando dodecilsulfato de sodio ("SDS-SEC"), la HPLC en fase inversa, y la electroforesis capilar, e incluyendo aquellos métodos descritos con más detalle en los ejemplos siguientes.

10 [0044] El término "etiquetado" cuando se usa en la presente invención se refiere a un polipéptido quimérico que comprende Apo2L/TRAIL, o una parte del mismo, fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos como para proporcionar un epítipo contra el cual puede prepararse un anticuerpo, o para proporcionar alguna otra función, tal como la quelación de iones metálicos, aunque es lo bastante corto como para que generalmente no interfiera con la actividad de la citocina de la familia de TNF. El polipéptido etiqueta preferiblemente es también bastante único, de forma que un anticuerpo específico para la etiqueta no reaccione sustancialmente de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta apropiados tienen generalmente al menos seis residuos aminoácidos, y usualmente entre 8 y aproximadamente 50 residuos aminoácidos (preferiblemente, entre desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 20 residuos).

20 [0045] El término "ion metálico divalente" se refiere a un ion metálico que tiene dos cargas positivas. Los ejemplos de iones metálicos divalentes incluyen pero no se limitan al zinc, cobalto, níquel, cadmio, magnesio y manganeso. Las formas concretas de dichos metales que pueden emplearse incluyen las formas de sal (por ejemplo, formas de sal farmacéuticamente aceptables), tales como las formas cloruro, acetato, carbonato, citrato y sulfato de los iones metálicos divalentes mencionados más arriba. Opcionalmente, un ion metálico divalente para usar en la presente invención es el zinc, y preferiblemente, la forma de sal, sulfato de zinc o cloruro de zinc.

30 [0046] "Aislado," cuando se usa para describir las diversas proteínas descritas en la presente invención, significa una proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos de la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferidas, la proteína se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa rotatoria, o (2) hasta su homogeneidad según SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata, o (3) hasta su homogeneidad según las técnicas de espectroscopia de masas o mapeado del péptido. La proteína aislada incluye la proteína *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del medio natural de Apo2L/TRAIL no estará presente. Sin embargo, ordinariamente, la proteína aislada se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

40 [0047] Una molécula de ácido nucleico de APO2L/TRAIL "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico de Apo2L/TRAIL. La molécula de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL aislada es diferente de la forma o disposición en que se halla en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL aisladas se diferencian de la molécula de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL tal como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL aislada incluye moléculas de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL contenidas en células que ordinariamente expresan Apo2L/TRAIL, donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se halla en una localización cromosómica distinta a la de las células naturales.

50 [0048] "Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos", en relación a las secuencias identificadas en la presente invención, se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia de Apo2L/TRAIL, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máxima porcentaje de identidad de la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. El alineamiento, para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos, puede conseguirse de varias formas que se hallan dentro de los conocimientos de la técnica, se pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo la asignación de los algoritmos necesarios para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de las secuencias de longitud completa que se están comparando. Para los propósitos en la presente invención, los valores del porcentaje de identidad de los aminoácidos puede obtenerse usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2, el cual fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente del cual se ha registrado con la documentación para el usuario en la U.S. Copyright Office, Washington, DC, 20559, registrado con el nº US Copyright Registration TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, CA. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

65 [0049] La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación es determinada fácilmente por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la

concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para un emparejamiento correcto, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para emparejarse de nuevo, cuando las hebras complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de identidad deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. A resultas de esto, se deduce que las temperaturas relativas más elevadas tenderán a hacer que las condiciones de reacción sean más rigurosas, mientras que las temperatura más bajas lo hacen menos. Para detalles y explicaciones adicionales sobre la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0050] Las "condiciones de elevada rigurosidad", tal como se definen en la presente invención, se identifican por ser aquéllas que: (1) emplean una baja fuerza iónica y una temperatura elevada para el lavado; cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/0,1% de dodecil sulfato de sodio a 50°C; (2) emplean un agente desnaturalizante durante la hibridación; 50% (v/v) de formamida con un 0,1% de albúmina de suero bovina/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/tampón de fosfato sódico 50mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico 0,1%, 5x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), 0,1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y 50% de formamida a 55°C, seguido por un lavado de elevada rigurosidad consistente en 0,1x SSC que contiene EDTA a 55°C.

[0051] Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse tal como describen Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la incubación durante la noche a 37°C en una solución que comprende: 20% de formamida, 5x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguida por el lavado de los filtros en 1x SSC a aproximadamente 37-50°C. El técnico en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etcétera, según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

[0052] El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión en un determinado organismo huésped de una secuencia codificante unida operativamente. Las secuencias de control que son apropiadas para los procariontes incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión de ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0053] El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o una secuencia líder secretora está unido operativamente a un ADN para un polipéptido, si éste se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un potenciador están operativamente unidos a una secuencia codificante si éstos afectan a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente a una secuencia codificante si está ubicado de forma que facilita la traducción. Generalmente, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en pauta de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen porque ser contiguos. La unión se consigue mediante la ligación en los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

[0054] El término "estable en el almacenamiento" se utiliza para describir una formulación que tiene una vida útil aceptable para un producto en la cadena de distribución del comercio, por ejemplo, por lo menos 12 meses a una temperatura determinada, y preferiblemente, por lo menos 24 meses a una temperatura determinada. Opcionalmente, dicha formulación estable en el almacenamiento contiene no más de un 5% de agregados, no más de un 10% de dímeros, y/o mínimos cambios en la heterogeneidad de carga o actividad biológica. Los mecanismos de degradación para proteínas pueden implicar inestabilidad química (es decir, cualquier proceso que implica la modificación de la proteína mediante la formación o separación de enlaces que dan lugar a una nueva entidad química) o la inestabilidad física (es decir, cambios en el orden estructural superior de la proteína). La inestabilidad química puede resultar de, por ejemplo, desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, beta eliminación o intercambio de disulfuro. La inestabilidad física puede resultar de, por ejemplo, de la desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción. Los tres mecanismos comunes de degradación de proteínas son la agregación, desamidación y oxidación de proteínas. Cleland *et al.* *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993).

[0055] Tal como se utiliza en la presente invención, "soluble" se refiere a polipéptidos que, cuando están en soluciones acuosas, están completamente disueltos, dando lugar a una solución de clara a ligeramente opalescente sin partículas visibles, evaluado mediante inspección visual. Se puede realizar un ensayo adicional de la turbidez de la solución (o solubilidad de la proteína) midiendo las absorbancias UV de 340 nm a 360 nm con una longitud de paso de 1 cm donde la turbidez a 20 mg/ml es inferior a 0,05 unidades de absorbancia.

[0056] Un "osmolito" se refiere a un modificador de la tonicidad o ajustador osmótico que proporciona osmolalidad a una solución. La osmolalidad se refiere a la actividad osmótica total contribuida por iones y moléculas no ionizadas a una solución. Ejemplos incluyen sales inorgánicas, tales como cloruro de sodio, polietilenglicoles (PEGs), propilenglicol, azúcares, tales como sacarosa o trehalosa, glicerol, aminoácidos, y alcoholes de azúcar, tales como manitol, conocidos en la técnica por considerarse en general como seguros (GRAS).

[0057] Los "conservantes" pueden actuar para evitar que proliferen bacterias, virus, y hongos en la formulación, y antioxidantes, u otros compuestos pueden actuar de varias maneras para conservar la estabilidad de la formulación. Entre los ejemplos se incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de benzetonio. Otros tipos de compuestos incluyen alcoholes aromáticos, tales como fenol y bencil alcohol, alquil parabens, tales como metil o propil paraben, y m-cresol. Opcionalmente, dicho compuestos es fenol o bencil alcohol. El conservante u otro compuestos se incluirá opcionalmente en forma líquida o acuosa de la formulación de Apo2L/TRAIL, pero normalmente no en una forma liofilizada de la formulación. En el último caso, el conservante u otro compuesto está normalmente presente en el agua para inyección (WFI) o agua bacteriostática para inyección (BWFI) utilizada para la reconstitución.

[0058] Un "tensoactivo" puede actuar para disminuir la turbidez o la desnaturalización de una proteína en una formulación. Ejemplos de tensoactivos incluyen tensoactivo no iónico, tal como un polisorbato, por ejemplo polisorbatos 20, 60, ó 80, un poloxámero, por ejemplo, poloxámero 184 ó 188, polioles plurónicos, polímeros de bloque de etileno/propileno o cualquier otro conocido en la técnica que sean GRAS. Opcionalmente, el tensoactivo es un polisorbato o poloxámero.

[0059] Un "tampón", tal como se utiliza en la presente invención, es cualquier tampón adecuado que es GRAS y, en general, confiere un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, opcionalmente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, y opcionalmente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5, si el polipéptido es Apo2L/TRAIL. Ejemplos incluyen Tris, Hepes, trietanolamina, histidina, o cualquier otro conocido en la técnica que tenga el efecto deseado.

[0060] El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales son ejemplos de tales citocinas. Entre las citocinas se incluyen las hormonas del crecimiento, tales como la hormona del crecimiento humana, la N-metionil hormona del crecimiento humana, y la hormona del crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorelaxina; las hormonas glicoproteicas tales como la hormona estimuladora del foliculo (FSH), la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; el factor- α y - β de la necrosis tumoral; la sustancia inhibidora de mullerian; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento del nervio; el factor de crecimiento de las plaquetas; los factores de crecimiento transformadores (TGF) tales como el TGF- α y TGF- β ; el factor-I y -II de crecimiento similar a la insulina; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; los interferones tales como el interferón- α , - β , y - γ ; los factores estimuladores de colonias (CSF), tales como el CSF de macrófagos (M-CSF); el CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y el CSF de granulocitos (G-CSF); las interleucinas (IL), tales como las IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; y otros factores polipeptídicos tales como el LIF y el ligando kit (KL). Tal como se usa en la presente invención, el término citocina incluye las proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes, y los equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

[0061] El término "agente citotóxico", tal como se usa en la presente invención, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya los isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), los agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

[0062] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los agentes alquilantes tales como la tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN®); los alquilsulfonatos tales como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas tales como la benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; las etileniminas y metilamelaminas, incluyendo la altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiófosforamida y trimetilolomelamina; las acetogeninas (especialmente la bulatacina y la bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); la briostatina; la calistatina; el CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongiatina; las mostazas nitrogenadas tales como el clorambucilo, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato del óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembiquina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitrosureas tales como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina, la ranimustina; los antibióticos tales como los antibióticos de enediyna (por

ejemplo, la caliqueamicina, especialmente la caliqueamicina gamma II y la caliqueamicina phill, véase, por ejemplo, Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; los bisfosfonatos, tales como el clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo de la neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediyna de cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (AdriamicinaTM) (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolinodoxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido frofínico; aceglatona; nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico, tales como ácido frofínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziacuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricótesenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida: tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (Taxotere®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina (GemzarTM); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NavelbinaTM); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como anti-estrógenos y moduladores de receptores de estrógeno selectivos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NolvadexTM), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (FarestonTM); inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MegaceTM), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (RivisorTM), letrozol (FemaraTM), y anastrozol (ArimidexTM); y anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprólido y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

[0063] Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en la presente invención, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente de una célula cancerosa que sobreexpresa cualquiera de los genes identificados en la presente invención, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan tales genes en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores incluyen los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en una etapa distinta de la fase S), tales como los agentes que inducen la detención en G1 y la detención en la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen vincas (vincristina y vinblastina), el taxol, y los inhibidores de la topo II tales como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etoposido y la bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también afectan en la detención en la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN tales como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y el ara-C. Puede hallarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, editores Mendelsohn e Israel, capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.*, (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente en la p. 13.

[0064] "Biológicamente activo" o "actividad biológica" para los propósitos en la presente invención significa (a) que tiene la capacidad de inducir o estimular o inhibir la apoptosis en al menos un tipo de célula cancerosa de mamífero o célula infectada viralmente, *in vivo* o *ex vivo*, bien solo, como un único agente, o en combinación con un agente quimioterapéutico, (b) capaz de desarrollar un anticuerpo, es decir, inmunogénico; (c) capaz de unir y/o estimular un receptor para el Apo2L/TRAIL (tales receptores pueden incluir el receptor DR4, el receptor DR5, el OPG, el receptor DcR1, y el receptor DcR2); o (d) que mantiene la actividad de un polipéptido Apo2L/TRAIL nativo o natural. Los ensayos para determinar la actividad biológica del Apo2L/TRAIL pueden llevarse a cabo usando procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como la fragmentación del ADN (véase, por ejemplo, Marsters *et al.*, Curr. Biology, 6:1669 (1996)), la inactivación de la caspasa, la unión al DR4, la unión al DR5 (véase, por ejemplo, WO 98/51793, publicada el 19 de noviembre de 1998), la unión del DcR1 (véase, por ejemplo, WO 98/58062, publicada el 23 de diciembre de 1998), la unión del DcR2 (véase, por ejemplo, WO 99/10484, publicada el 4 de marzo de 1999) así como los ensayos descritos en las publicaciones del PCT con n° WO97/01633, WO97/25428, WO 01/00832, y WO 01/22987.

[0065] Los términos "apoptosis" y "actividad apoptótica" se utilizan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada o controlada de muerte celular en mamíferos que está acompañada habitualmente por uno o más cambios celulares característicos, incluyendo la condensación del citoplasma, la pérdida de microvellosidades de la membrana plasmática, segmentación del núcleo, degradación del ADN cromosómico o pérdida de función mitocondrial. Esta actividad se puede determinar y medir, por ejemplo, mediante ensayos de viabilidad celular (tales como ensayos de azul Alamar o ensayos MTT), análisis FACS, activación de caspasa, fragmentación de ADN (véase, por ejemplo, Nicoletti et al., J. Immunol. Methods, 139:271-279 (1991), y poli-ADP ribosa polimerasa, "PARP", ensayos de separación conocidos en la técnica.

[0066] Tal como se usa en la presente invención, el término "trastorno" se refiere en general a cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con las composiciones descritas en la presente invención, incluyendo cualquier enfermedad o trastorno que pueda tratarse mediante cantidades efectivas de un péptido de polipéptidos, tales como Apo-2L/TRAIL. Esto incluye los trastornos crónicos y agudos, así como aquellas condiciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a ser tratados en la presente invención incluyen los cánceres benignos o malignos; los trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, los trastornos autoinmune, la artritis (incluyendo la artritis reumatoide), la esclerosis múltiple, y el VIH/SIDA.

[0067] Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular descontrolado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan al carcinoma, el linfoma, la leucemia, el blastoma, y el sarcoma. Los ejemplos más concretos de tales cánceres incluyen el carcinoma de célula escamosa, el mieloma, el cáncer pulmonar de célula pequeña, el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el glioma, el cáncer gastrointestinal, el cáncer renal, el cáncer de ovarios, el cáncer de hígado, la leucemia linfoblástica, la leucemia linfocítica, el cáncer colorectal, el cáncer del endometrio, el cáncer renal, el cáncer de próstata, el cáncer de tiroides, el neuroblastoma, el cáncer de páncreas, el glioblastoma multiforme, el cáncer del cuello del útero, el cáncer de estómago, el cáncer de vejiga, hepatoma, el cáncer de mama, el carcinoma de color, y los cánceres de cabeza y cuello. Opcionalmente, las células cancerosas expresan el receptor o receptores DR4 y/o DR5.

[0068] Los términos "tratar", "tratamiento" y "terapia" tal y como se usan en la presente invención se refieren a la terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva. El tratamiento o administración consecutiva se refiere al tratamiento con, al menos, una base diaria sin interrumpir el tratamiento en uno o más días. El tratamiento o administración intermitente, o tratamiento o administración de forma intermitente, se refiere al tratamiento que no es consecutivo, sino más bien cíclico por naturaleza.

[0069] El término "mamífero" tal y como se usa en la presente invención se refiere a cualquier mamífero clasificado como un mamífero, incluyendo los humanos, las vacas, los caballos, los perros y los gatos. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un humano.

[0070] El término "poliol", cuando se utiliza en la presente invención, se refiere ampliamente a compuestos de alcoholes polihídricos. Los polioles pueden ser, por ejemplo, cualquier polímero poli(óxido de alquileo) soluble en agua, y pueden tener una cadena lineal o ramificada. Los polioles preferidos incluyen los sustituidos en una o más posiciones hidroxilo con un grupo químico, tal como un grupo alquilo que tiene entre uno y cuatro carbonos. Habitualmente, el poliol es un poli(alquilenglicol), preferiblemente poli(etilenglicol) (PEG). Sin embargo, los expertos en la materia entienden que otros polioles, tales como, por ejemplo, poli(propilenglicol) y copolímeros de polietileno-polipropilenglicol, se pueden utilizar para la conjugación a proteínas y otras biomoléculas. Los polioles incluyen los conocidos en la técnica y los disponibles para el público, tales como de fuentes comercialmente disponibles.

B. Métodos de ejemplo y materiales para llevar a cabo la invención

[0071] La presente invención proporciona métodos para la recuperación y purificación de Apo2L/TRAIL. En particular, la invención proporciona métodos, que implican la cristalización, para recuperar y purificar Apo2L/TRAIL de mezclas en las que está acompañado por otros contaminantes, tales como proteínas contaminantes y otras impurezas. En una realización específica, la presente invención proporciona métodos para recuperar y purificar Apo2L/TRAIL de cultivos huésped recombinante o lisatos celulares, tales como lisatos de células huésped recombinantes de E. coli productoras de Apo2L/TRAIL.

[0072] La base para estos métodos de purificación es el hallazgo inesperado de que el Apo2L/TRAIL cristaliza fácilmente y espontáneamente en ciertos sistemas tampón. Este hallazgo permite utilizar la cristalización como una etapa de purificación eficiente en el esquema de purificación de Apo2L/TRAIL. En particular, el trabajo experimental subyacente de la presente invención ha demostrado que la cristalización se puede implementar como una etapa en el proceso de purificación de APO2L/TRAIL y otras proteínas que muestran una tendencia similar de cristalización espontánea. La incorporación de una etapa de cristalización en el esquema de purificación permite la reducción de las etapas de purificación manteniendo rendimientos comparables con los rendimientos para esquemas de orificación tradicionales que utilizan múltiples etapas de purificación cromatográfica, sin cristalización. Por

consiguiente, la implementación de la cristalización en el proceso de purificación puede dar lugar en un ahorro destacado de tiempo y gastos, sin comprometer la eficacia, los rendimientos de producto o calidad de producto.

B.1 Producción de Apo2L/TRAIL

5 [0073] La siguiente descripción se refiere a métodos de producción de Apo2L/TRAIL mediante el cultivo de células huésped transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica Apo2L/TRAIL y la recuperación del polipéptido del cultivo celular.

10 [0074] EL ADN que codifica Apo2L/TRAIL se puede obtener de cualquier biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de Apo2L/TRAIL y lo expresa en un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de Apo2L/TRAIL humano se puede obtener de manera práctica a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejidos humanos, tales como biblioteca de bacteriófagos de ADNc de placenta humana descrita en la Publicación de PCT WO97/25428. El gen que codifica Apo2L/TRAIL también se puede obtener a partir de la biblioteca genómica o mediante síntesis de oligonucleótidos.

15 [0075] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para el Apo2L/TRAIL u oligonucleótidos de por los menos aproximadamente de 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteínas codificada por el mismo. El cribado del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica Apo2L/TRAIL es utilizar la metodología PCR (Sambrook et al., supra; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

20 [0076] Los fragmentos de secuencias de aminoácidos o variantes de Apo2L/TRAIL se pueden preparar mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de Apo2L/TRAIL o mediante la síntesis del polipéptido Apo2L/TRAIL deseado. Dichos fragmentos o variantes representan inserciones, sustituciones y/o deleciones de residuos en la región intracelular, la región transmembrana o la región extracelular, o en uno o ambos extremos de las mismas, o de la secuencia de aminoácidos mostrada para el Apo2L/TRAIL de longitud completa en la figura 1 (SEC ID N. 1). Se puede realizar cualquier combinación de inserción, sustitución y/o delección se puede para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea, por ejemplo, una actividad biológica deseada o actividad apoptótica tal como se define en la presente invención. En una realización preferida, los fragmentos o variantes tienen por los menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente, por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia, e incluso más preferiblemente, por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad en la secuencia con, por ejemplo, las secuencias identificadas en la presente invención para los dominios intracelular, transmembrana o extracelular de Apo2L/TRAIL, o la secuencia de longitud completa para Apo-2L/TRAIL. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del Apo2L/TRAIL, tales como el cambio en el número o posición de sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclaje a membrana.

25 [0077] Las variaciones en la secuencia de Apo2L/TRAIL tal como se ha descrito anteriormente se pueden realizar utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para las mutaciones conservativas y no conservativas establecidas en la Patente US No. 5.364.934. Éstas incluyen mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), barrido de alanina y mutagénesis de PCR.

30 [0078] Se puede utilizar el análisis por barrido de aminoácidos para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácidos de barrido preferido entre este grupo, ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. (Cunningham et al., Science 1989, 244:1081). La alanina es también habitualmente preferida porque es el aminoácido más común. Además, se observa frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., NY); Chothia, J. Mol. Biol. 1976, 150:1).

35 [0079] Las variantes de Apo2L/TRAIL particulares de la presente invención incluyen aquellos polipéptidos Apo2L/TRAIL que incluyen una o más de las sustituciones de alanina indicadas en la Tabla 1 de la solicitud PCT publicada WO 01/00832. Dichas variantes de Apo2L/TRAIL comprenderán habitualmente una secuencia de aminoácidos no naturales que difieren de una secuencia de aminoácidos de Apo2L/TRAIL nativa (tal como la proporcionada en la figura 1; SEC ID No. 1, para una forma de longitud completa o madura de Apo2L/TRAIL o una secuencia del dominio extracelular del mismo) en por lo menos uno o más aminoácidos. Opcionalmente, el uno o más aminoácidos que difieren en la variante de Apo2L/TRAIL en comparación con un Apo2L/TRAIL nativo comprenderá una sustitución o sustituciones, tales como las indicadas en la Tabla I de WO 01/00832. Las variantes de Apo2L/TRAIL de la invención incluyen las variantes de Apo2L/TRAIL soluble que comprenden los residuos 91-281, 92-281, 95-281 ó 114-281 de la figura (SEC ID NO:1) y que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Las variantes de Apo2L/TRAIL preferidas incluirán aquellas variantes que comprenden los residuos 91-281, 92-281, 95-281 ó 114-281 de la figura 1 (SEC ID NO:1) y que tienen una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan

la actividad biológica, tal como la unión a receptor. Una variante particularmente preferida comprende los residuos 114-281 de la figura 1 (SEC ID NO:1). En una realización específica, Apo-2L/TRAIL consiste en los residuos 114-281 de la figura 1 (SEC ID NO:1).

5 **[0080]** Tal como se describe en WO 01/00832 publicada el 4 de enero de 2001, se identificó la estructura cristalina por rayos X del dominio extracelular de Apo2L/TRAIL y se realizó la mutagénesis por barrido de alanina para proporcionar el mapeo de sus regiones de contacto a receptor. La estructura obtenida para Apo2L/TRAIL reveló una proteína homotrimérica que contiene un sitio de unión a ion metálico divalente (zinc) nuevo que coordina la interacción de las tres subunidades de la molécula trímero de Apo2L/TRAIL. Como otros miembros de la familia de TNF, el Apo2L/TRAIL parece comprender un trímero compacto formado de tres monómeros arrollados que se esconden aproximadamente 5100 Angstrom² (1700 Angstrom² por monómero) para formar el trímero globular. La posición de las hebras beta centrales se conservaron bien en comparación con los otros miembros estructuralmente caracterizados de la familia TNF, TNF alfa, TNF-beta, y CD40L cuando se comparan con las hebras centrales de TNF-alfa o TNF-beta.

15 **[0081]** Variaciones en la secuencia de Apo2L/TRAIL también incluidas en el alcance de la invención se refieren a derivados o formas modificadas. Dichas secuencias de Apo2L/TRAIL pueden incluir cualquiera de los polipéptidos de Apo2L/TRAIL descritos en la presente invención que tienen una metionina o metionina modificada (tal como formil metionilo u otra especie de metionilo bloqueada) en el extremo N-terminal de la secuencia de polipéptidos.

20 **[0082]** El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica Apo2L/TRAIL nativo o variante se puede insertar en un vector replicable para la clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen diversos vectores disponibles al público. Los componentes del vector incluyen, en general, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción, cada uno descrito a continuación. Las secuencias señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores y secuencias terminadoras de la transcripción opcionales que se pueden utilizar son conocidos en la técnica y se describen en detalle en la Publicación PCT WO97/25428.

25 **[0083]** Los vectores de expresión y clonación contienen normalmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos de Apo2L/TRAIL. Los promotores son secuencias no traducidas localizadas en dirección 5' con respecto al codón de partida de un gen estructural (en general en aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y la traducción de una secuencia de ácidos nucleicos particulares, tal como la secuencia de ácidos nucleicos de Apo2L/TRAIL, a la que están unidos operativamente. Dichos promotores se encuentran habitualmente en dos clases, inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles incrementados de transcripción de ADN bajo su control en respuesta a algunos cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Actualmente se conocen un gran número de promotores reconocidos por un conjunto de potenciales células huésped. Estos promotores se unen operativamente a ADN que codifica Apo2L/TRAIL mediante la eliminación del promotor del ADN origen mediante la digestión con enzimas de restricción y la inserción de la secuencia de promotor aislada en el vector. Tanto la secuencia de promotor de Apo2L/TRAIL nativo como muchos promotores heterólogos se pueden utilizar para dirigir la amplificación y/o la expresión del ADN de Apo2L/TRAIL.

30 **[0084]** Los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas y eucariotas son conocidos en la técnica y se describen en detalle en la Publicación PCT No. WO97/25428.

35 **[0085]** Los métodos preferidos para la producción de Apo2L/TRAIL soluble en E. coli utilizan un promotor inducible para la regulación de la expresión del producto. La utilización de un promotor controlable inducible permite el crecimiento del cultivo hasta una densidad celular deseable antes de la inducción de la expresión del producto y la acumulación de cantidades significativas de producto que pueden no ser bien toleradas por el huésped.

40 **[0086]** Los solicitantes han evaluado varios sistemas de promotores inducibles (incluyendo T7 polimerasa, trp y fosfatasa alcalina (AP)) para la expresión de Apo2L/TRAIL (aminoácidos 114-281). La utilización de cada uno de los promotores T7 polimerasa, trp y fosfatasa alcalina dio lugar a la recuperación de cantidades significativas de trímero de Apo2L/TRAIL soluble biológicamente activo de las pasta celular recogida. Otro promotor opcional es un sistema de promotores de glicerol-fosfato.

45 **[0087]** La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes indicados anteriormente utiliza técnicas de unión estándar. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se dividen, se adaptan y se vuelven a unir en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

50 **[0088]** Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, se utilizan mezclas de unión para transformar la cepa 294 de E. coli K12 (ATCC 31.446) y se seleccionan transformantes satisfactorios mediante la resistencia a ampicilina o tetraciclina cuando sea apropiado. Se preparan los plásmidos a partir de transformantes, se analizan mediante la digestión con endonucleasa de restricción y/o se secuencian mediante

utilizando técnicas conocidas en el sector (véase, por ejemplo, Messing et al., *Nucleic Acids Res.*, 9: 309 (1981), Maxam et al., *Methods in Enzymology*, 65: 499 (1980)).

[0089] Se pueden utilizar vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria en células de mamífero de ADN que codifica Apo2L/TRAIL. En general, la expresión transitoria implica la utilización de un vector de expresión que es capaz de replicarse de manera eficaz en una célula huésped, de manera que la célula huésped acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza niveles elevados de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión (Sambrook et al., *supra*). Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula huésped, permiten la identificación positiva conveniente de polipéptidos codificados por ADNs clonados, así como el rápido cribado de dichos polipéptidos por sus propiedades biológicas o fisiológicas deseadas. De este modo, los sistemas de expresión transitoria son particularmente útiles en la invención con fines de identificar análogos y variantes de Apo2L/TRAIL que son Apo2L/TRAIL biológicamente activos.

[0090] Otros métodos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de Apo2L/TRAIL en un cultivo celular vertebrado recombinante se describe en Gething et al., *Nature* 1981, 293:620-625; Mantei et al., *Nature* 1979, 281:40-46; EP 117,060; y EP 117,058.

[0091] Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores. Las procariotas adecuadas para este objetivo incluyen, pero sin limitación, eubacteria, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilli, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266,710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Preferiblemente, la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas.

[0092] *E. coli* es la célula huésped preferida para utilizar en la presente invención. *E. coli* es particularmente adecuada para la expresión de Apo2L/TRAIL (que comprende los aminoácidos 114-281 de la figura 1), un polipéptido de menos de 20 kd de tamaño sin necesidad de glicosilación. Como huésped de producción, se puede cultivar *E. coli* hasta una densidad celular relativamente elevada y es capaz de producir niveles relativamente elevados de proteínas heterólogas.

[0093] Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de expresión o clonación adecuados para vectores que codifican Apo2L/TRAIL. Las células huésped adecuadas para la expresión de Apo2L/TRAIL glicosilado derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de dichas células huésped, incluyendo células CHO, se describen en detalle en la Publicación PCT No. WO97/25428.

[0094] Las células huésped se transfectan y preferiblemente se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de Apo2L/TRAIL y se cultivan en medio nutriente modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0095] Transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula huésped tanto si se expresan o no cualquiera de las secuencias codificantes. Se conocen numerosos métodos de transfección por los expertos en la materia, por ejemplo, CaPO₄ y electroporación. La transfección satisfactoria se reconoce en general cuando cualquier indicación de la operación de este vector tiene lugar en la célula huésped.

[0096] Transformación significa introducir el ADN en un organismo, de manera que el ADN es replicable, ya sea como elemento extracromosómico o mediante un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro de calcio, tal como se ha descrito en Sambrook et al., *supra*, o la electroporación, se utiliza generalmente para células procariotas u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como se ha descrito (Shaw et al., *Gene* 1983, 23:315 y Publicación PCT No. WO 89/05859). Además, las plantas se pueden transfectar utilizando tratamiento con ultrasonido, Publicación PCT No. WO 91/00358 publicada el 10 de enero de 1991.

[0097] Para células de mamífero sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el método de precipitación de fosfato de calcio (Graham and van der Eb, *Virology* 1978, 52:456-457). Los aspectos generales de transformaciones de sistemas de huéspedes de células de mamífero se han descrito en la patente US No. 4.399.216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo habitualmente según el método de Van Solingen et al., *J. Bact.* 1977, 130:946 y Hsiao et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76:3829. Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamíferos, véase Keown et al. *Methods in Enzymology* 1990, 185:527-537 y Mansour et al. *Nature* 1988, 336:348-352.

[0098] Las células procariotas utilizadas para producir Apo2L/TRAIL se pueden cultivar en medios de cultivo adecuados tal como se describen en general en Sambrook et al., supra. Las formas particulares de medios de cultivo que se pueden utilizar para cultivar *E. coli* se describen en detalle en la solicitud PCT WO 01/00832. En un proceso particularmente preferido, el APO2L/TRAIL (que comprende los aminoácidos 114-281 de la figura 1) producido en *E. coli* se fermenta utilizando un suministro de zinc y glicerofosfato. Las titulaciones de fermentación varían preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 g/l.

[0099] Las células huésped de mamífero utilizadas para producir Apo2L/TRAIL se pueden cultivar en un conjunto de medios de cultivo.

[0100] Entre los ejemplos de medios de cultivo disponibles comercialmente se incluyen F10 Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle modificado por Dulbecco ("DMEM", Sigma). Cualquiera de dichos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenósido y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamycin™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario en las concentraciones apropiadas que serán conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquellas utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para los expertos en la materia.

[0101] En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos de células de mamíferos se pueden hallar en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

[0102] La expresión del Apo2L/TRAIL se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77: 5201-5205), transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación in situ, utilizando una sonda marcada apropiadamente, en base a las secuencias proporcionadas en la presente invención. Se pueden utilizar varios marcadores, más habitualmente radioisótopos, y particularmente ³²P. Sin embargo, también se pueden utilizar otras técnicas, tales como utilizando nucleótidos modificados por biotina para la introducción en un polinucleótido. La biotina sirve entonces como el punto de unión a avidina o anticuerpos, que se puede marcar en una amplia variedad de marcadores, tales como radionucleótidos, fluorescentes o enzimas. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluyendo cadenas doble de ADN, cadenas doble de ARN, y cadenas doble de híbridos de ADN-ARN o cadenas dobles de ADN-proteína. Los anticuerpos se pueden marcar a su vez y el ensayo se puede llevar a cabo donde la cadena doble se une a una superficie, de manera que tras la formación de cadena doble en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpo unido a la cadena doble.

[0103] Alternativamente, la expresión génica se puede medir mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y el ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Con las técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra celular, habitualmente mediante deshidratación y fijación, seguido de reacción con anticuerpos marcados específicos para el producto génico acoplado, donde los marcadores son visualmente detectables, tales como marcadores enzimáticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, y similares.

[0104] Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de muestra puede ser monoclonal o policlonal y se pueden preparar en cualquier mamífero. De manera conveniente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido Apo2L/TRAIL nativo o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada al ADN de Apo2L/TRAIL y que codifica un epitopo de anticuerpo específico.

[0105] El polipéptido Apo-2L se puede unir covalentemente (de aquí en adelante "conjugarse") a uno o más grupos químicos. Los grupos químicos adecuados para utilizar en un conjugado de Apo-2L son preferiblemente no significativamente tóxicos o inmunogénicos. Un conjunto de grupos químicos de ejemplo que se pueden conjugar a polipéptidos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tales como los carbohidratos que aparecen de forma natural en glicoproteínas, poliglutamato y polímeros no proteínicos, tales como polioles (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 6.245.901).

[0106] Un poliol, por ejemplo, se puede conjugar a polipéptidos, tales como un Apo-2L en uno o más residuos de aminoácidos, incluyendo residuos de lisina, tal como se describe en WO 93/00109, supra. El poliol utilizado puede ser un polímero poli(óxido de alquileno) soluble en agua y puede tener una cadena lineal o ramificada. Los polioles adecuados incluyen aquellos sustituidos en una o más posiciones hidroxilo con un grupo químico, tal como un grupo alquilo que tiene entre uno y cuatro carbonos. Habitualmente, el poliol es un poli(alquilenglicol), tal como

poli(etilenglicol) (PEG), y de este modo, para facilitar la descripción, el resto de la discusión se refiere a una realización de ejemplo en el que el poliol utilizado es PEG y el proceso de conjugación del poliol a un polipéptido se denomina "pegilación". Sin embargo, los expertos en la materia reconocen que se pueden utilizar otros polioles, tales como, por ejemplo, poli(propilenglicol) y copolímeros de polietileno-polipropilenglicol, utilizando las técnicas para conjugación descritas en la presente invención para PEG.

[0107] El peso molecular promedio del PEG empleado en la "pegilación" del Apo-2L puede variar, y habitualmente puede variar desde aproximadamente 500 a aproximadamente 30.000 daltons (D). Preferiblemente, el peso molecular promedio del PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 25.000 D, y más preferiblemente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 D. En una realización, la "pegilación" se lleva a cabo con PEG que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 1.000 D. Opcionalmente, el homopolímero de PEG está no sustituido, pero también puede estar sustituido en un extremo con un grupo alquilo. Preferiblemente, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1-C4, y lo más preferible un grupo metilo. Las preparaciones de PEG están disponibles comercialmente y, habitualmente, las preparaciones de PEG adecuadas para utilizar en la presente invención son preparaciones no homogéneas vendidas según el peso molecular promedio. Opcionalmente, se "pegilará" el trímero de Apo-2L de manera que una molécula de PEG se une o conjuga a uno, dos o cada uno de los tres monómeros que forman el Apo-2L trimérico. En dicha realización, se prefiere que el PEG empleado tenga un peso molecular promedio de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 D. También se contempla que los trímeros de Apo-2L se puedan "pegilar" parcialmente, es decir, donde sólo uno o dos de los tres monómeros que forman el trímero se unen o conjugan a PEG.

[0108] En la técnica se conocen diversos métodos para "pegilar" proteínas. Ente los métodos específicos de producción de proteínas conjugadas a PEG se incluyen los métodos descritos en la Patente US No. 4.179.337, Patente U.S. No. 4.935.465 y Patente U.S. No. 5.849.535. Habitualmente, la proteína se une covalentemente a través de uno o más residuos de aminoácidos de la proteína a un grupo reactivo terminal en el polímero, dependiendo principalmente de las condiciones de reacción, el peso molecular del polímero, etc. El polímero con el grupo o grupos reactivos se designa en la presente invención como polímero activado. El grupo reactivo reacciona de forma selectiva con grupos amino libres u otros grupos reactivos en la proteína. El polímero PEG se puede acoplar al grupo amino u otro grupo reactivo en la proteína al azar en un sitio específico.

B.2 Cristalización de Apo2L/TRAIL

[0109] La cristalización se utiliza ampliamente para la purificación de moléculas pequeñas. Sin embargo, en general, las técnicas de cristalización no se han aplicado ampliamente para proteínas ya que varios parámetros pueden afectar a la cristalización de las proteínas, incluyendo, por ejemplo, solubilidad, velocidad de nucleación y crecimiento, y distribución del tamaño del cristal (siendo cada uno una función de parámetros adicionales, tales como solubilidad, temperatura, pH, tampón, impurezas y similares). Dado que las proteínas son en general más difíciles de cristalizar que las moléculas pequeñas, la recuperación y purificación de proteínas terapéuticas hasta la fecha raramente han implicado una etapa o etapas de cristalización.

[0110] Los solicitantes hallaron sorprendentemente que el estado sólido de la proteína Apo2L/TRAIL 5°C es cristalina en condiciones de fuerza iónica de moderada a baja, a diferencia de muchas otras proteínas conocidas en la técnica que son solubles o forman precipitados amorfos bajo condiciones similares. Además, se halló que el estado sólido de los cristales de Apo2L/TRAIL se solubiliza reversiblemente cuando se lleva a temperatura ambiente sin pérdida de actividad biológica de la proteína o efectos adversos en las propiedades bioquímicas de la proteína. Esta observación era bastante diferente de la desnaturalización o precipitación irreversible observada para otras proteínas conocidas en la técnica.

[0111] De manera opcional, los cristales de Apo2L/TRAIL se preparan mediante el enfriamiento de una solución supersaturada de proteína Apo-2L-TRAIL de aproximadamente 20 a aproximadamente 30°C hasta por debajo de 15°C, preferiblemente aproximadamente 2 a 8°C, más preferiblemente, por debajo de aproximadamente 2-8°C, incluso más preferiblemente por debajo de aproximadamente 4°C, lo más preferible hasta aproximadamente 2 a 4°C. Opcionalmente, la concentración de Apo2L/TRAIL puede ser superior a 3 g/L a efectos de iniciar una cristalización espontánea. Se pueden utilizar antisolventes para iniciar la cristalización espontánea a concentraciones de proteína más bajas. La cristalización se puede llevar a cabo en modo de lotes o semi-lotes en un amplio intervalo de escala, desde varios mililitros a cientos de litros de solución. La velocidad de cristalización se puede controlar mediante enfriamiento programado y agitación. El equipo puede incluir, pero sin limitación, tanques agitados o estáticos con un control de la temperatura de superficie y/o interna. También se pueden utilizar deflectores internos y tubos de aspiración para aumentar la mezcla en tanques agitados. La nucleación de cristales también se puede controlar mediante el sembrado [Moore, AIChE Practical Engineering Perspectives, Distillation and Other Industrial Separations, pág. 239-245]. El grado de supersaturación, la composición de sales, la velocidad de enfriamiento, la velocidad de agitación y el sembrado, entre otros parámetros, pueden afectar a la velocidad de deformación del cristal, la distribución de tamaños de los cristales, y producción de cristales.

[0112] Opcionalmente, para preparar los cristales, la solución de proteína Apo2L/TRAIL contiene sulfato de sodio o cloruro de sodio. Opcionalmente, la concentración de sales es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente

200 mM y opcionalmente el pH es de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, preferiblemente, pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5).

B.3 Uso de la cristalización en la recuperación y la purificación de APO2L/TRAIL

[0113] En los procedimientos de la presente invención, la cristalización es una etapa en la recuperación y la purificación de Apo2L/TRAIL, y opcionalmente es una etapa en el esquema de una columna o de dos columnas para la recuperación y la purificación de Apo2L/TRAIL.

[0114] En una realización particular, se purifica Apo2L/TRAIL a partir de un cultivo de huésped recombinante o lisato celular, o lisato de celular aclarado utilizando un proceso de purificación que incluye una etapa de cristalización. Si se produce Apo2L/TRAIL en *E. coli*, habitualmente se recoge el caldo de células completas y se homogeniza para abrir las células de *E. coli* y liberar el Apo2L/TRAIL soluble dentro del citoplasma. Después de eliminar los restos celulares sólidos, por ejemplo mediante centrifugación, se carga la mezcla en una resina cromatográfica de intercambio catiónico, como, por ejemplo, SP-Sefarosa de Flujo Rápido o CM-Sefarosa de Flujo Rápido (Amersham Pharmacia, Sweden). En los Ejemplos 2 y 3 se proporcionan los protocolos habituales para la purificación de Apo2L/TRAIL de caldo celular obtenido mediante fermentación de *E. coli*.

[0115] En un protocolo habitual, el pH del caldo de células completas obtenido mediante fermentación de las células de *E. coli* se ajusta hasta aproximadamente 7,5, por ejemplo mediante la adición de HEPES de sodio o cualquier otro tampón adecuado. Preferiblemente, se añade un agente reductor, como 1,4-ditio-treitol (DTT) o β -mercaptoetanol, para evitar la formación de enlaces disulfuro entre los monómeros enlazados no covalentemente de Apo2L/TRAIL. Se rompen las células mediante uno o más pases sobre un homogenizador de alta presión disponible comercialmente, se eliminan los restos celulares, y se aclara el lisato celular. Los parámetros específicos del tratamiento, tales como la selección y la concentración de los reactivos, dependen de la composición del caldo de células completas inicial, tales como, por ejemplo, la densidad celular.

[0116] A continuación se carga la mezcla que contiene Apo2L/TRAIL, tal como un lisato celular aclarado, en una primera columna cromatográfica, utilizando una resina de intercambio catiónico. La cromatografía de intercambio catiónico retiene biomoléculas mediante la interacción de grupos cargados que son ácidos en la naturaleza en la superficie de la resina con histidina, lisina y arginina. Las resinas de intercambio catiónico se encuentran disponibles comercialmente en líneas de productos de diversos fabricantes, tales como, por ejemplo, Sigma Aldrich. Los intercambiadores catiónicos incluyen resinas que llevan, por ejemplo, grupos funcionales carboximetilo (intercambiador catiónico débil, tal como CM celulosa/Sephadex) o grupos funcionales de ácido sulfónico (intercambiador catiónico fuerte, tal como SP Sephadex). En la primera etapa de purificación cromatográfica de los procedimientos de la presente invención se prefieren columnas de intercambio catiónico fuerte, por ejemplo SP-Sefarosa®, intercambiadores catiónicos fuertes Spectra/Gel®, etc., intercambiadores catiónicos fuertes TSKgel, etc. En el caso de una columna de SP-Sefarosa®, la matriz de agarosa reticulada con grupos funcionales cargados negativamente se une a Apo2L/TRAIL mientras que permite que la mayoría de las impurezas y variantes de Apo2L/TRAIL pasen a través de la columna. Puede realizarse la elución utilizando una elución en gradiente de sales o elución por etapas, siendo preferente la elución por etapas ya que proporciona mejores condiciones para la etapa de cristalización posterior, sin comprometer los rendimientos. El tampón de elución normalmente contiene cloruro sódico o sulfato sódico, y se selecciona la concentración de sal para cumplir con las exigencias de la columna de intercambio catiónico y la etapa de cristalización posterior. La columna de SP-Sefarosa® necesita una concentración de sales bastante alta para extraer la proteína Apo2L/TRAIL unida, mientras que para la etapa de cristalización posterior se prefieren concentraciones de sales relativamente bajas con el objetivo de disminuir la solubilidad de la proteína. Habitualmente, se utilizan concentraciones de aproximadamente 100-150 mM de Na_2SO_4 o 100-200 mM de NaCl. Un tampón de elución habitual consiste en NaCl 200 mM, HEPES 50 mM, Triton X-100 al 0.05%, DTT 1 mM, pH 7,5.

[0117] La concentración de Apo2L/TRAIL en el intercambio catiónico, por ejemplo el flujo de elución de SP-Sefarosa®, influye en el rendimiento teórico para la etapa de cristalización siguiente. La concentración debe ser lo suficientemente alta como para maximizar las diferencias de solubilidad a temperaturas más bajas, pero no tan alta como para desencadenar la cristalización espontánea a temperatura ambiente o alrededor de la misma.

[0118] En un protocolo representativo, se emplean dos etapas de lavado entre la carga y la elución de la proteína Apo2L/TRAIL. El primer lavado utiliza tampón de equilibrio, y el segundo es un lavado con sales, utilizando un tampón idéntico al tampón de elución posterior, excepto que utiliza una menor concentración de sales (por ejemplo NaCl 100 mM en lugar de NaCl 200 mM).

[0119] La etapa de elución de SP, que incluye las dos etapas de lavado, produce habitualmente concentraciones de Apo2L/TRAIL alrededor de 3-6 g/L, tales como aproximadamente 5 g/L con rendimientos de alrededor del 80-90%. La etapa de lavado con sales da lugar a la pérdida de la proteína activa, por tanto, eliminando esta etapa, el rendimiento puede incrementarse por encima del 95%. No obstante, la eliminación de esta etapa también disminuye la capacidad de la columna de eliminar endotoxinas y proteínas extracelulares, disminuyendo de este modo la pureza.

[0120] Se somete directamente a cristalización, sin ninguna etapa más adicional de purificación, pero incluyendo opcionalmente la filtración estéril, el flujo que deja la columna de intercambio catiónico. La cristalización se realiza habitualmente mediante la disminución gradual de la temperatura de aproximadamente 15-30°C hasta aproximadamente de 2 a 8°C en un margen de tiempo que puede prolongarse hasta las 60 horas, pero habitualmente es más corto, tal como, por ejemplo, aproximadamente de 1 a 8 horas.

[0121] En un proceso de cristalización habitual, se transfiere el flujo de elución que deja la columna de intercambio catiónico a un tanque de temperatura controlada con agitación adecuada. Es importante asegurarse de que el recipiente y la solución de proteína están libres de cualquier partícula antes de la cristalización, con el objetivo de evitar la nucleación en base a dichas partículas sólidas, que influiría en la cinética de la cristalización. Para aplicaciones a pequeña escala, por ejemplo, puede utilizarse un recipiente de reacción Applikon® de 1 ó 2 litros. En el recipiente de 1 L, se controla la temperatura mediante unos tubos en espiral de enfriamiento inmersos en el recipiente. El recipiente de reacción de 2 L contiene un revestimiento de intercambio de calor. Puede producirse una rampa de temperatura lineal en ambos recipientes utilizando un baño de intercambio de calor programable (por ejemplo PolyScience Programmable Temperature Circulator Modelo 1157). Normalmente el recipiente está equipado con un agitador para mezclar firmemente la solución, y suspender los cristales una vez formados. La velocidad de agitación se encuentra habitualmente alrededor de 250 rpm para una escala de 0,4 L y se escala para flujos más grandes manteniendo una proporción de potencia con respecto al volumen, proporcional a N^3/V (agitador de diámetro constante).

[0122] Se ha descubierto que la solubilidad de Apo2L/TRAIL se incrementa con concentraciones de sal crecientes, y Apo2L/TRAIL es aproximadamente igualmente soluble en sulfato sódico y cloruro sódico. Los cristales formados en cloruro sódico tienen un grosor más exagerado en comparación con los cristales formados en sulfato sódico, que son en apariencia más planos. Debido a ello, los cristales producidos en cloruro sódico son más fáciles de separar mediante filtración, lo cual hace que el cloruro sódico sea la sal preferente. Como tampones de base, HEPES y TRIS proporcionan habitualmente resultados comparables.

[0123] La solubilidad de Apo2L/TRAIL disminuye con el incremento del pH dentro de un intervalo de aproximadamente pH 7,0 y 8,0. Un pH más alto tiende a incrementar los rendimientos pero puede hacer a los cristales más amorfos en apariencia. Además, los cristales son más grandes a mayor pH, pero también más frágiles. En vista de estas consideraciones, un pH preferente que produce la morfología de cristal deseada es $7,3 \pm 0,1$.

[0124] La rampa de temperatura utilizada durante la cristalización (habitualmente desde aproximadamente temperatura ambiente hasta aproximadamente 2°C) no tuvo efecto significativo en el tamaño de cristal promedio o la distribución de tamaño entre aproximadamente 1 y 24 horas. No obstante, tal y como se expone en las reivindicaciones, también puede utilizarse una velocidad de enfriado no lineal para mejorar adicionalmente el perfil de tamaño del cristal mediante el mantenimiento de un nivel de sobresaturación constante a medida que la cristalización progresa. Debido a que Apo2L/TRAIL no cristaliza espontáneamente en los sistemas de tampón de la presente invención hasta que la temperatura está por debajo de aproximadamente 8°C, preferiblemente por debajo de aproximadamente 5°C, es posible hacer caer la temperatura rápidamente hasta alrededor de 10°C y a continuación enfriar el flujo lentamente para permitir la cristalización.

[0125] El tamaño del cristal está influenciado por la velocidad de agitación. Probando tres tipos diferentes de velocidades de agitación (100 rpm, 175 rpm y 250 rpm), se descubrió que la cristalización era más rápida con las velocidades de agitación más elevadas, pero la distribución del tamaño del cristal y la apariencia de los cristales fue muy similar para las velocidades de agitación de 175 rpm y 250 rpm. A velocidades inferiores, los cristales no se suspenden completamente, y puede tener lugar la agregación de los cristales. A velocidades de agitación más altas debe tenerse cuidado de no dañar la proteína soluble mediante la exposición a efectos de cizalla en la interfase aire/líquido.

[0126] Puede mejorarse la eficiencia de la cristalización disminuyendo la solubilidad de Apo2L/TRAIL. De este modo, el rendimiento global de la etapa de cristalización se controla en parte mediante la solubilidad de Apo2L/TRAIL en el flujo enfriado recogido de la primera columna de cromatografía de intercambio catiónico. Los dos factores que afectan al rendimiento están en la concentración inicial de Apo2L/TRAIL en el flujo de elución recogido de la primera columna de cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo columna SP), y la concentración de Apo2L/TRAIL soluble en la mezcla de cristales (es decir la cantidad de Apo2L/TRAIL que no cristaliza). El Apo2L/TRAIL que todavía está en solución después de la cristalización se perderá durante la filtración. La adición de antisolventes puede cambiar la química de la solución para disminuir la solubilidad en equilibrio:

Rendimiento teórico porcentual = $\frac{[Apo2L]_{22c} - [Apo2L]_{4c}}{[Apo2L]_{22c}} \times 100\%$,
 en el que las cantidades de los subíndices indican los valores de temperatura.

[0127] Reduciendo el Apo2L/TRAIL en solución, se extrae menos proteína cuando se filtra las aguas madre. Los antisolventes, también conocidos como agentes de precipitación, son bien conocidos en la técnica y pueden actuar de varias maneras. Algunos antisolventes deshidratan la solución absorbiendo agua. Esto reduce esencialmente la

actividad del agua disponible para disolver la proteína (ver, por ejemplo McPherson, A., 1998, Crystallization of Biological Macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview NY).

5 **[0128]** El polietilenglicol (PEG) es un antidisolvente ampliamente utilizado, un polímero disponible en un amplio intervalo de pesos moleculares. Tal y como se muestra en los Ejemplos, en los procedimientos de la presente invención el PEG de mayor peso molecular (3350 y 10000) proporcionó mejores resultados. Otros polímeros que pueden utilizarse como antidisolventes incluyen, por ejemplo, Eudragit RS, etilcelulosa, alcohol isopropílico, etanol, dioxano, y 2-metil-2,4-pentandiol (MPD).

10 **[0129]** Cuando se completa la cristalización, se extraen los cristales de Apo2L/TRAIL, por ejemplo mediante filtración. Los cristales pueden mantenerse suspendidos a través de la filtración, utilizando un agitador incorporado, o puede depositarse en un lecho empaquetado. Es importante evitar la formación de una torta de cristal comprimido, que podría dificultar conseguir la velocidad de flujo deseada. Por tanto, deben minimizarse las diferencias de presión a lo largo del lecho empaquetado. Las velocidades de flujo pueden variar, y habitualmente están entre
15 aproximadamente 200 cm/h y aproximadamente 100 cm/h. La velocidad de flujo puede depender del equipo utilizado, y la diferencia de presión aplicada durante la filtración. Puede realizarse la filtración por lotes o continuamente. Puede lograrse una purificación adicional, por ejemplo, lavando el lecho de cristal depositado con una solución que no disuelve sustancialmente los cristales de Apo2L/ TRAIL, tal como una solución enfriada (2-8C) de TRIS de baja molaridad a un pH de 7,5 aproximadamente.

20 **[0130]** Después de la cristalización y la separación, pueden disolverse y almacenarse los cristales de Apo2L/TRAIL o convertirse en una formulación apta para el uso pretendido.

25 **[0131]** Alternativamente, puede añadirse una etapa de purificación de cromatografía adicional para mejorar adicionalmente la pureza eliminando los residuos de antidisolvente (PEG) y los componentes de tampón, y reducir los niveles de proteínas extracelulares residuales, endotoxina, dímeros, y agregados. La segunda columna cromatográfica, utilizada después de la cristalización, puede ser una columna de intercambio catiónico, o una columna de interacción hidrofóbica. Debido a que el flujo de cristalización es muy puro, habitualmente no es necesario utilizar un modo de separación de unir-y-eluir (tal y como se utiliza habitualmente con SP-Sefarosa o CM-Sefarosa), una columna de flujo continuo, como la resina Fenil Sefarosa HIC, mostrará habitualmente un buen rendimiento. Se ha evaluado el uso de ambos tipos de resina, intercambio catiónico en un modo de unir-y-eluir y HIC en modo de flujo continuo, y los resultados se discuten en los Ejemplos. Se descubrió que mientras una etapa de cromatografía de unir y eluir proporciona una herramienta muy potente para la purificación inicial, en la segunda etapa de la purificación por cromatografía, la cromatografía de interacción hidrofóbica en Fenil-Sefarosa es suficiente para proporcionar la pureza y los rendimientos deseados. Debido a que ésta es una etapa de flujo continuo, proporciona rendimientos excelentes y reduce el número de soluciones requeridas para completar la operación en comparación con la cromatografía de unir y eluir.

40 **B.4 Uso de Apo2L/TRAIL**

45 **[0132]** Los métodos de la presente invención proporcionan una alternativa efectiva, eficiente y que ahorra gastos a, por ejemplo, protocolos de purificación que requieren múltiples purificaciones en columna. Tal como se ha descrito anteriormente, en una realización, el esquema de purificación de la presente invención implica la utilización de una única columna de intercambio catiónico, seguido de cristalización. Los cristales de Apo2L/TRAIL obtenidos por el método de la presente invención se pueden secar para su almacenamiento. El secado del material cristalino también puede reducir sustancialmente el volumen de almacenamiento y proporcionar un modo eficaz de almacenamiento en masa que evita la congelación del material purificado a bajas concentraciones en la solución de la formulación. La mezcla de cristales a concentración muy elevada de proteína se puede congelar en recipientes de volumen más pequeño.

50 **[0133]** En otra realización, se recogen los cristales de Apo2L/TRAIL, se lavan con tampón (o agua) (preferiblemente un tampón frío a una temperatura de aproximadamente 2 a 8°C). Los cristales lavados se pueden resuspender o redisolverse a temperatura ambiente. El Apo2L/TRAIL resolubilizado se puede purificar posteriormente mediante cromatografía de interacción hidrofóbica o mediante una segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico tal como se ha descrito anteriormente, se recristaliza, se lava y se guarda en un material en masa cristalino húmedo. Alternativamente, se puede omitir la interacción hidrofóbica u otra etapa de cromatografía a favor de simplemente una recristalización.

60 **[0134]** El material en masa cristalino húmedo se puede almacenar a -20°C o secar para el almacenamiento a temperatura ambiente o a 2-8°C. Preferiblemente, el material cristalino secado se resolubiliza en una formulación que contiene succinato de arginina. Opcionalmente, dicha formulación se puede filtrar de forma estéril y/o llenar en viales de dosificación individuales y liofilizarse para la reconstitución o suspensión posterior. Opcionalmente, la formulación cristalina secada se puede rellenar como un polvo en viales y convertirse en una solución o suspensión. Puede ser deseable conseguir un contenido de agua de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% en los
65 cristales de Apo2L/TRAIL secados.

5 [0135] Las formulaciones de Apo2L/TRAIL se pueden utilizar en un conjunto de aplicaciones terapéuticas y no terapéuticas. Ente estas aplicaciones se encuentran los métodos de tratamiento de trastornos, tales como cáncer, condiciones relacionadas con el sistema inmune, o condiciones virales. Dichas aplicaciones terapéuticas y no terapéuticas se describen en detalle en, por ejemplo, WO97/25428, WO97/01633, y WO 01/22987.

10 [0136] En los métodos de la invención para el tratamiento de un trastorno utilizando una formulación descrita en la presente invención, la formulación de Apo2L/TRAIL se puede administrar directamente al mamífero mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo infusión o inyección. La ruta de administración específica dependerá, por ejemplo, del historial médico del paciente, incluyendo cualquier efecto secundario percibido o anticipado utilizando Apo2L/TRAIL y el trastorno concreto a corregir. Entre los ejemplos de administración parenteral se incluyen administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial e intraperitoneal de la composición. Las formulaciones se administran preferiblemente como inyecciones o infusiones intravenosas (i.v), subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), fusiones intracraneales o como formulaciones de aerosol adecuadas para la liberación intranasal o intrapulmonar (para la liberación intrapulmonar, véase, por ejemplo, EP 257,956).

15 [0137] Cabe indicar que la presión osmóticas de las inyecciones puede ser importante en la inyección subcutánea e intramuscular. Las soluciones inyectables, cuando son hipotónicas o hipertónicas, pueden causar dolor a un paciente tras la infusión. Normalmente, para las formulaciones inyectables terapéuticas de la presente invención, se prefiere que la osmolaridad relativa de la solución inyectable sea de aproximadamente 300 mosm a aproximadamente 600 mosm.

20 [0138] También se puede administrar Apo2L/TRAIL en forma de preparación de liberación prolongada. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la proteína, cuyas matrices están en forma de artículos conformadas, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa), acetato isobutirato de sacarosa (SABER™) en medio no acuoso, poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 1981, 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98-105 o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente U.S. No. 3,773,919, EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers 1983, 22: 547-556), etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer et al., supra), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como Lupron Depot (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de luprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988). Un método opcional de liberación para fármacos de acción sistémica implica: la administración mediante infusión continua (utilizando, por ejemplo, dispositivos de liberación lenta o minibombas, tales como bombas osmóticas o parches para la piel), o mediante inyección (utilizando, por ejemplo, medios intravenosos o subcutáneos, incluyendo administración de bolo único).

25 [0139] La composición a utilizar en terapia se formulará y dosificará de una manera concordante con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición clínica del paciente individual, el sitio de administración de la composición, el método de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos por los médicos. Las "cantidades eficaces" de cada componente para los objetivos de la presente invención se determinan así mediante dichas consideraciones y son cantidades que dan lugar a la biodisponibilidad del Apo2L/TRAIL u otros fármacos al mamífero.

30 [0140] Como proposición general, la cantidad farmacéuticamente efectiva total de los polipéptidos Apo2L/TRAIL administrados estará en el intervalo desde aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día en base a los kg de peso corporal del paciente, aunque, tal como se ha indicado anteriormente, esto estará sujeto al criterio terapéutico.

35 [0141] aunque se prefiere una inyección, también se puede utilizar un dispositivo de infusión para infusiones continuas. También se puede utilizar una solución intravenosa en bolsa.

40 [0142] Se contempla que se pueden utilizar terapias adicionales en los métodos. El uno o más de otras terapias pueden incluir, pero no se limitan a, la administración de terapia por radiación, citosina o citocinas, agente o agentes inhibidores del crecimiento, agente o agentes quimioterapéuticos, agente o agentes citotóxicos, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de ras farnesil transferasa, inhibidores de la angiogénesis, e inhibidores de quinasa dependientes de ciclina que son conocidos en la técnica y se definen en detalle particularmente en la Sección I anterior. Además, terapias basadas en anticuerpos terapéuticos que reconocen antígenos tumorales, tales como Rituxan™ o Herceptin™, así como anticuerpos antiangiogénicos, tales como anti-VEGF, o anticuerpos que reconocen los receptores de Apo2L, tales como DR5 o DR4.

45 [0143] La preparación y las pautas de dosificación para los agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante o tal como se ha determinado empíricamente por el experto en la materia. La preparación y las pautas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

[0144] Puede ser deseable también administrar anticuerpos contra otros antígenos, tales como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, CD40, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, factor endotelial vascular (VEGF), u otros miembros de la familia de TNFR (tales como DR4, DR5, OPG, TNFR1, TNFR2). Alternativamente, o adicionalmente, dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más antígenos diferentes descritos aquí se pueden administrar simultáneamente al paciente. Algunas veces, puede ser beneficioso también administrar una o más citocinas al paciente. En una realización, las formulaciones de Apo2L se pueden administrar simultáneamente con un agente inhibidor del crecimiento.

[0145] La formulación de Apo2L/TRAIL se puede administrar conjuntamente o secuencialmente con otros de dichos agentes. Por ejemplo, la formulación de Apo2L/TRAIL o un agente quimioterapéutico se pueden administrar como pretratamiento (antes de la administración de cualquiera de dichos otros agentes), tales como un pretratamiento de células cancerosas que en cualquier caso pueden ser resistentes a los efectos apoptóticos de Apo2L/TRAIL.

[0146] La presente invención proporciona kits que incluyen una formulación descrita en la presente invención. Un kit habitual comprenderá un recipiente, preferiblemente un vial, para Apo2L/TRAIL en uno o más excipientes tal como se han descrito anteriormente; e instrucciones, tales como un prospecto o etiqueta, que dirigen al usuario en cómo utilizar la formulación de Apo2L/TRAIL. Esto proporcionaría preferiblemente una formulación farmacéutica. Preferiblemente, la formulación farmacéutica es para tratar el cáncer o una condición relacionada con el sistema inmune. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una formulación de Apo2L/TRAIL que es eficaz para diagnosticar o tratar el trastorno y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón agujereable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta en el recipiente o asociada con el mismo indica que la formulación se utiliza para el diagnóstico o el tratamiento del trastorno de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende agua para inyección, una solución farmacéuticamente aceptable, solución de Ringer, o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

EJEMPLOS

[0147] Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos, y no pretende limitar de ningún modo el alcance de la presente invención. Se utilizaron reactivos disponibles comercialmente referidos en los ejemplos según las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria, por los números de acceso ATCC, es la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

EJEMPLO 1: Producción de Apo2L/TRAIL en E. coli y purificación mediante múltiples etapas cromatográficas (sin cristalización)

[0148]

A. La proteína Apo2L/TRAIL que consistía en los aminoácidos 114-281 (ver Figura 1) se expresó en E. coli bajo el control del promotor AP (preparación y expresión descrita en el ejemplo 8 (sección A) de WO 01/00832 publicada el 4 de enero de 2001), y se purificó a partir de los lisatos celulares de E. coli mediante tres etapas cromatográficas que consistían en intercambio de cationes, hidroxapatita, y cromatografía de interacción hidrofóbica (WO 01/00832, Ejemplo 8, Sección C). En la tercera separación cromatográfica, la proteína Apo2L/TRAIL se eluyó en sulfato de sodio 600 mM o sulfato de amonio 400 mM, Tris 50 mM, pH 7,5.

B. Otro método para la purificación de Apo2L/TRAIL consistía en cuatro etapas cromatográficas y dos etapas de ultrafiltración/diafiltración (UFDF). El caldo de las células completas celular obtenido del proceso de producción de E. coli se homogenizó para romper las células de E. coli y liberar el APO2L/TRAIL soluble que se encuentra en el citoplasma. El residuo celular sólido se extrajo a continuación mediante centrifugación.

[0149] Se realizó un aislamiento primario mediante la unión y una elución gradiente en una columna de intercambio catiónico (CEX) (Columna de Flujo Rápido SP-Sefarosa). A continuación, el eluato se transfirió a una columna de cromatografía de hidroxapatita (HA), seguido de cromatografía de interacción hidrofóbica (Fenil-Sefarosa). Después de una etapa de ultrafiltración/diafiltración (UFDF), la mezcla se cargó en una columna de Flujo Rápido CM-Sefarosa, y la proteína eluida se concentró mediante una etapa final de UFDF.

Ejemplo 2: Cristalización de Apo2L/TRAIL como método de recuperación y purificación después de una purificación en una columna

[0150] La propensión de la cristalización de Apo2L/TRAIL en soluciones de sulfato de sodio se utilizó como medio de purificación de la proteína Apo2L/TRAIL de extractos de E. coli. Se utilizó el siguiente protocolo para la recuperación y purificación de Apo2L/TRAIL recombinante sin afectar de forma adversa a la calidad de la proteína.

5 [0151] El caldo de las células completas recogido derivado de E. coli (descrito en el ejemplo 1) se ajustó a pH 7,5 con Hepes 1,5 M (o Tris 1,5 M) y, a continuación, se homogeneizó en un homogeneizador (Gaulin corporation, Everett, MA) a 6.500 psi. El homogenato se diluyó uno a uno con DTT 5 mM en agua puro. Una vez la solución alcanzó la temperatura ambiente, se añadió polietilénimina (PEI) para producir una concentración final de 0,1%, y la solución se floculó durante 1-2 horas. El material floculado se centrifugó mediante una centrifuga de alimentación continua BTPX205 (Alfa Laval Separation AB, Suecia) y se aclaró mediante filtración de profundidad. El lisato celular aclarado (extracto) se condicionó con Triton-X100 hasta una concentración final de 0,05%. El lisato celular aclarado y condicionado se cargó a continuación sobre una columna de intercambio catiónico (resina de intercambio catiónico SP-Sefarosa FF, Amersham Pharmacia, Suecia), se equilibró en Hepes 50 mM (ó Tris 50 mM)/Triton-X 100 al 0,05%/DTT 1 mM, pH 7,5. El Apo2L/TRAIL se unió a la columna, mientras que las proteínas que no se unen fluyen a través de la columna y se extrajeron mediante lavado con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm alcanzó la línea base. A continuación, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de NaCl 0,1 M en tampón de equilibrio. El Apo2L/TRAIL se eluyó por etapas utilizando NaCl 0,1 M (o Na₂SO₄ 0,1 M) en 50 mM de cada uno de los tampones Hepes, Tris, y trietanolamina, Triton-X 100 al 0,05% y DTT 1 mM, pH 7,8.

20 [0152] El flujo con Apo2L/TRAIL a temperatura ambiente recogido de la columna SP se colocó en un tanque de acero inoxidable con una camisa aislada para calentar y enfriar. El tanque se equipó con una base cónica y una válvula de botón de evacuación para la recuperación máxima de la proteína cristalizada. El flujo se agitó utilizando una paleta de tipo marino bajo condiciones de mezclado modestas. Se utilizó un soporte para el control de temperatura para realizar una rampa lineal de temperaturas desde aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 4°C durante el transcurso de 1 hora. Se observó cristalización espontánea en varios minutos después de que el flujo alcanzó los 4°C. Después de más de 12 horas bajo estas condiciones, se completó la cristalización ya que la solubilidad de equilibrio estaba casi establecida. A continuación se capturaron los cristales en un dispositivo de filtración que contenía un filtro sinterizado de 20 µm. Después de la deposición de cristales en la superficie del filtro, los cristales se lavaron con Tris 20-50 mM enfriado a pH 7,5. A continuación, se utilizó un volumen igual de tampón de lavado en comparación con el volumen del flujo en SP de Apo2L/TRAIL para eliminar las aguas madres residuales (sobrenadante) de los cristales depositados. Después del lavado, los cristales se disolvieron en sulfato de sodio 100 mM/Tris 20 mM a pH 7,5 mediante la recirculación del tampón de disolución a través del lecho del cristal a aproximadamente 30°C. Se observó la disolución de los cristales en aproximadamente 4 horas. A continuación, el Apo2L/TRAIL purificado disuelto se filtraron de manera estéril en un recipiente y se almacenó congelado a -70°C.

35 [0153] La pureza de las preparaciones de Apo2L/TRAIL se determinó mediante ensayos ELISA de la proteína de E. coli total (ECP), ensayo de Limulus Amebocyte Lysate (LAL), y tinción con plata por SDS-PAGE. Se realizó ELISA de ECP mediante la inmoviliación de anticuerpos anti-ECP global de cabra purificados por afinidad en pocillos de placas de microtitulación, la incubación de muestras y a continuación ECP conjugadas con peroxidada de rábano picante. La actividad enzimática de peroxidada se cuantificó a continuación con o-fenilendiamina mediante la lectura de la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de microtitulación. Se determinó el nivel de endotoxina utilizando el ensayo de lisis de coágulos Limulus Amebocyte. La tinción con plata por SDS-PAGE se realizó en un gel de poliacrilamida en un gradiente de 10 a 20% (Daiichi Pure Chemicals) en tampón Tris-glicina que contenía SDS al 0,1%. La electroforesis se realizó a una corriente constante de 50 mA hasta que el frente del colorante alcanzó casi la base del gel. Los geles se fijaron y se tiñeron mediante métodos de tinción con Azul Brillante de Coomassie o con plata de Merrill.

45 [0154] La calidad de las proteínas se valoró mediante SEC, SDS-SEC, IEX, y la bioactividad según los métodos descritos en el ejemplo 1.

50 [0155] La pureza y la calidad de Apo2L/TRAIL recuperado utilizando el método de cristalización anterior a una escala de fermentación de 60 L se muestra en la tabla 1. Para comparar, también se muestra un patrón de referencia purificado mediante un método con tres etapas cromatográficas tal como se describe en el ejemplo 1.

Tabla 1

Prep. Apo2L/TRAIL	Pureza de proteína			Calidad de proteína			
	ECP (ppm)	LAL (EU/mg)	SDS-PAGE	%trímero mediante SEC	% de monómero mediante SDS-SEC	% Bioactividad de control (± 20%)	% IEX pico principal
Apo2L/TRAIL purificado por cristalización	10	0,034	Sin banda a 10 kDa	99,0	99,0	126	63
Material de referencia purificado mediante cromatografía estándar	0,82	0,023	Banda a ~ 10 kDa	98,9	98,9	86	61

5 [0156] Tal como se muestra en la tabla 1, la preparación de Apo2L/TRAIL a escala de fabricación presentaba un grado elevado de pureza adecuada para el uso terapéutico. Los datos indican que la proteína Apo2L/TRAIL purificada por la etapa de "una columna" es susceptible de cristalización y presenta una pureza comparable o mejor que la proteína Apo2L/TRAIL purificada mediante el método de purificación de tres columnas descrito en el ejemplo 1. La figura 3 muestra el efecto del tipo de sal en la cristalización de un Apo2L/TRAIL purificado mediante una etapa de una columna. Se observó el "envenenamiento" de la cristalización por cationes divalentes para Apo2L/TRAIL parcialmente purificado (figura 3).

10 [0157] Las propiedades bioquímicas de Apo2L/TRAIL tampoco quedaron afectadas de manera adversa por la cristalización del Apo2L/TRAIL parcialmente purificado (véase la tabla 1). Los datos sugieren que la cristalización de Apo2L/TRAIL expresado de forma recombinante cuando en estado parcialmente purificado, puede ser un medio eficaz, eficiente y rentable para su purificación. Opcionalmente, dichos cristales se pueden utilizar a continuación para la preparación de la masa secada para el almacenamiento o formulaciones de liberación controlada.

15 **Ejemplo 3: Método para la recuperación y purificación de Apo2L/TRAIL que utiliza la cristalización incluyendo una segunda etapa de cromatografía después de la cristalización (purificación en dos columnas)**

20 [0158] El caldo de las células completas recogidas derivadas de E. coli (descrito en el ejemplo 1) se ajustaron a pH 7,5 con Hepes 1,5 M (o Tris 1,5 M). Se añadió DTT hasta 5 mM para evitar la formación de enlaces disulfuro entre los monómeros unidos de manera no covalente. Dos pasos en un homogenizador (Gaulin Corporation, Everett, MA) a 6,500 psi rompieron las células de E. coli. A continuación, el lisato se diluyó uno a uno con DTT 5 mM en agua pura. Una vez se alcanzó la temperatura ambiente, se añadió PEI al 5% para producir una concentración final de PEI al 0,2%. PEI provocó la floculación de los sólidos de las células y el material se mezcló durante por lo menos 30 minutos antes de centrifugarse para permitir la floculación completa. Después de la centrifugación, el lisato aclarado se filtró utilizando un filtro de profundidad Cuno Maximizer 30/60SP (Cuno Incorporated, Meriden, CT). Antes de cargar el lisato aclarado en la columna de SP Sefarosa, el pH se ajustó a 7,5 utilizando Na HEPES 1 M y la conductividad se ajustó por debajo 9,5 mS/cm utilizando DTT 5 mM en agua.

25 [0159] Como en el método de purificación descrito en el ejemplo 2, se eligió la resina de SP-Sefarosa, una resina de fuerte intercambio catiónico, para la primera etapa de captura. La matriz de agarosa reticulada con grupos funcionales cargados negativamente se unieron a APO2L/TRAIL, mientras que se deja que una mayoría de impurezas y variantes de APO2L/TRAIL pasan a través de la columna. Se utilizaron las siguientes condiciones de tampón: 200 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0,05% Triton X-100, 1 mM DTT, pH 7,5.

30 [0160] La cristalización del flujo de elución de SP se consiguió mediante una rampa de temperatura controlada desde 22°C a 4 °C durante un periodo de cuatro horas. El flujo de elución de SP se filtró de forma estéril y se transfirió a un tanque de temperatura controlada con buena agitación. Era importante asegurar que el recipiente y la solución de proteína no contenían ninguna partícula antes de la cristalización. A medida que se enfriaba el flujo de SP, los cristales se formaban espontáneamente con una longitud de cuerda promedio de 44 µm determinada mediante la tecnología de Medición por Reflectancia del Haz Focalizado de Lasantec. La morfología del cristal tenía caras hexagonales con una profundidad de aproximadamente la mitad de la longitud de la cuerda más larga. Después de mantener el flujo durante aproximadamente 1 a 2 horas a 4 °C para permitir que disminuya la velocidad de crecimiento del cristal, se añadió PEG3350 para producir una concentración final de PEG3350 al 5%. La adición de PEG 3350 (un antidisolvente) disminuyó la solubilidad de APO2L/TRAIL e indujo un crecimiento adicional del cristal.

35 [0161] A continuación, los cristales formados se extrajeron mediante filtración, por lotes o de forma continua. En ambos casos, se extrajeron las aguas madre y los cristales se lavaron para eliminar las impurezas y el disolvente

residual. Se realizó la filtración a 2-8 °C. La mezcla de cristales se transfirió a un filtro de tipo Buchner o Nutsche que contenía un filtro de malla de acero sinterizado, polipropileno sinterizado o acero de 5-20 µm mediante la desviación o presurización del tanque contiene la mezcla de cristales. A continuación, los cristales se rascaron manualmente del filtro o se disolvieron en un sistema tampón adecuado para la siguiente etapa de purificación.

5 [0162] Antes de cargarse en una columna de CM-Sefarosa, los cristales se disolvieron en arginina-succinato 0,5 M/TRIS 20 mM/pH 7,2. Antes de cargar en una columna de Fenil-Sefarosa, los cristales se disolvieron en Na₂SO₄ 0,6 mM/TRIS 50 mM/pH 7,5.

10 [0163] La etapa de cromatografía después de la cristalización sirvió para eliminar PEG y los componentes del tampón del grupo de proteínas en cristal y para proporcionar una eliminación moderada de ECPs, endotoxina, dímeros y agregados.

15 [0164] En un grupo de experimentos, se utilizó en esta etapa una columna de unión y elución C-Sefarosa. Antes de cargar esta columna, los cristales de APO2L/TRAIL se disolvieron en tampón de formulación, arginina-succinato 0,5 M/TRIS 20 mM pH 7,2 y el grupo disuelto se diluyó 5 veces con TRIS 20 mM. El grupo de cristales disueltos se cargó en la columna y se eluyó con NaCl 125 mM/TRIS 50 mM/DTT 1 mM/pH 7,5. La operación en columna se repitió varias veces para mostrar una recuperación (85-95%) y pureza consistente.

20 [0165] En otro grupo de experimentos, se utilizó una columna de flujo, Fenil Sefarosa HIC. En este caso, los cristales se disolvieron en NaSO₄ 0,6 M/TRIS 50 mM/DTT 1 mM/pH 7,5. La solubilidad de APO2L/TRAIL era muy elevada en esta solución debido a la concentración elevada de sal. Tres pruebas produjeron rendimientos constantes del 98% y los cromatogramas fueron casi idénticos. El nivel de pureza fue elevado, tal como se observa utilizando la columna de unión y elución CM-Sefarosa.

25 **Ejemplo 4: Selección de las condiciones de cristalización**

[0166] El flujo de elución con SP-Sefarosa de la primera etapa de purificación por cromatografía descrita en el ejemplo 3 se enfrió hasta producir cristales y a continuación se calentó hasta disolver los cristales múltiples veces.

30 [0167] Se utilizó un analizador del tamaño de partícula a tiempo real (Lasentec Focused Beam Reflectance Measurement - FBRM) para hacer el seguimiento de la longitud de la cuerda del cristal y la distribución a través del proceso de cristalización. En el método FBRM, se gira rápidamente un láser en una trayectoria circular. A medida que el láser pasa sobre el cristal, el haz de luz se refleja durante cierto tiempo, el cual se multiplica por la velocidad del láser giratorio para producir una "longitud de cuerda".

Efecto de la velocidad de enfriamiento de la temperatura

40 [0168] Se utilizó FBRM para hacer el seguimiento del perfil del crecimiento de cristales en función de la velocidad de enfriamiento de la temperatura. La velocidad de enfriamiento afecta al tiempo requerido para la cristalización y la distribución de tamaño final. Una velocidad de enfriamiento lenta supersatura la solución lentamente y la nucleación y crecimiento de los cristales se vuelve lenta. Un enfriamiento rápido induce una supersaturación elevada y se forman muchos cristales pequeños.

45 [0169] Se investigó una rampa lineal de temperaturas de 22 °C a 2 °C durante varios periodos de tiempo. Los resultados de las distribuciones de los cristales en equilibrio durante los periodos de enfriamiento de 1, 4, 8 y 24 horas se muestran en la figura 4 y se establecen en la Tabla 2.

Tabla 2

Tiempo de enfriamiento (horas)	Tamaño promedio (µm)	# de partículas (1-32 µm)	Solubilidad (g/L)
1	38 ± 20	810	0,81
4	43 ± 22	560	0,74
8	39 ± 18	550	1,0
24	44 ± 22	500	0,82

50 [0170] Una velocidad de enfriamiento de 4 horas produjo resultados aceptables.

Efecto de la agitación en el tamaño del cristal

55 [0171] Se cristalizaron aproximadamente 0,4 L de tampón de elución de SP a tres velocidades de agitación. Los estudios de las tres velocidades eran la mínima requerida para suspender la mayoría de los cristales (100 RPM), la máxima velocidad de agitación antes de arrastrarse en burbujas de aire (250 RPM), y una velocidad de agitación en el centro (175 RPM). Se observó que la cristalización era más rápida con la velocidad de agitación más elevada (250 RPM). La distribución de tamaño de los cristales fue muy similar para los experimentos desarrollados a 175 RPM y 250 RPM, y no hubo diferencias destacables en las imágenes microscópicas. 100 RPM no proporcionó una agitación

suficiente para suspender completamente todas las partículas. Además, se observó cierta agregación de los cristales. En todos los casos, las paletas estaban próximas a la superficie del aire y era fácil arrastrarse al aire. En aplicaciones a gran escala esta geometría podría cambiar y se pueden utilizar velocidades de agitación más elevadas sin dañar la proteína por la exposición a la interfase aire-líquido.

Estudios de antidisolventes

[0172] Los antidisolventes utilizados en el proceso de cristalización mejoran la eficacia de la cristalización mediante la disminución de la solubilidad de la proteína. Dado que cualquier proteína que permanezca en la disolución se pierde durante la filtración, es importante que la solubilidad sea la más baja posible durante la reacción de cristalización.

[0173] Los antidisolventes se cribaron rellenando jeringas de 5 mL con cristales de APO2L/TRAIL o flujo de elución de SP y, a continuación, añadiendo una cantidad de antidisolvente. Las muestras reagitaron lentamente durante un periodo de tiempo dos semanas tanto a temperatura ambiente como 2-8 °C. Se pasaron muestras de 1 mL a través de un filtro de 0,22 µm para extraer todos los cristales de proteína y, a continuación, se pasaron por HPLC IEX para determinar la concentración de APO2L/TRAIL en solución.

[0174] Se analizaron polietilenglicol (PEG) en pesos moleculares de 400, 3350 y 10000 Da (PEG 440, PEG 3350 y PEG 10000, respectivamente) como antidisolvente. Los cristales de APO2L/TRAIL se disolvieron en el tampón de elución de SP (NaCl 200 mM, HEPES 50 mM, Triton X-100 al 0,05%, DTT 1 mM, pH 7,5), y se añadió PEG. Las mezclas se agitaron durante 5 días a una temperatura de 2-8 °C. Los resultados mostrados en la figura 5 indican que PEG3350 y PEG 10000 son superiores a PEG 400 y son casi idénticos en términos de la mejora del rendimiento. La adición de PEG 3350 al 5% mejoró el rendimiento teórico desde aproximadamente 85% a aproximadamente 96% en relación a la cristalización sin la adición de PEG o cualquier otro antidisolvente.

[0175] A continuación, se examinó el efecto del etanol y el alcohol isopropílico en la solubilidad de APO2L/TRAIL. Se observó que ambos proporcionaban incrementos de rendimiento significativos con concentraciones entre 5% y 10%. La solubilidad en equilibrio de APO2L/TRAIL en la utilización de estos disolventes fue aproximadamente equivalente a la de PEG.

[0176] También se analizaron otros antidisolventes orgánicos utilizados habitualmente, concretamente 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), etilenglicol, y dioxano, pero proporcionaron pocos beneficios o ninguno en cuanto a la reducción de la solubilidad de APO2L/TRAIL.

[0177] En base a estos estudios, se ha determinado que se pueden conseguir buenos resultados y rendimientos de cristalización mediante el enfriamiento del flujo de elución de SP con una rampa de temperatura lineal entre 22°C y 4°C, utilizando un periodo de enfriamiento de 4 horas, y PEG 3350 como antidisolvente.

Ejemplo 5: Proceso de purificación en dos columnas utilizando antidisolvente en la etapa de cristalización

[0178] Se purificó el APO2L/TRAIL esencialmente tal como se describe en el ejemplo 3, pero añadiendo 5% PEG 3350 durante la cristalización. Después de la cristalización, el material se separó en 6 grupos, 3 se pasaron por una columna CM-Sefarosa y otras 3 en una columna Fenil-Sefarosa. Los resultados de rendimiento y pureza se indican en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4

Etapa	Rendimiento de la etapa	ECP (ppm)	LAL (EU/mg)
Homogenización		$1,6 \times 10^6$	85,3
Columna SP-Sefarosa	89%	172,90	1,9
Cristalización	96%	9,1	1,9
Columna CM-Sefarosa (opción # 1)	86%	1,3	1,02
Columna Fenil-Sefarosa (Opción # 2)	98%	< 0,35	0,23

[0179] La presente invención no debe limitarse en el alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente invención. De hecho, serán evidentes varias modificaciones de la invención además de las ya descritas aquí para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras que se acompañan. Dichas modificaciones pretenden estar en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0180]

5 <110> GENENTECH, INC.
 FLORES, HEATHER
 LIN, TANYA P.
 MATTHEWS, TIMOTHY C.
 PAI, ROGER
 10 SHAHROKH, ZAHRA
 <120> FORMULACIONES DE LIGANDO APO-2/TRAIL
 <130> 39766-0174P2 PCT
 <140> A ASIGNAR
 <141> CON LA PRESENTE
 15 <150> US 11/136,842
 <151> 2005-05-24
 <160> 2
 <170> FastSEC for Windows Version 4.0
 <210> 1
 20 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 1

25	Met	Ala	Met	Met	Glu	Val	Gln	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Gln	Thr	Cys
	1				5					10					15	
	Val	Leu	Ile	Val	Ile	Phe	Thr	Val	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Cys	Val	Ala
				20					25					30		
30	Val	Thr	Tyr	Val	Tyr	Phe	Thr	Asn	Glu	Leu	Lys	Gln	Met	Gln	Asp	Lys
			35					40					45			
	Tyr	Ser	Lys	Ser	Gly	Ile	Ala	Cys	Phe	Leu	Lys	Glu	Asp	Asp	Ser	Tyr
	50						55					60				
35	Trp	Asp	Pro	Asn	Asp	Glu	Glu	Ser	Met	Asn	Ser	Pro	Cys	Trp	Gln	Val
	65				70					75						80
	Lys	Trp	Gln	Leu	Arg	Gln	Leu	Val	Arg	Lys	Met	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser
				85					90					95		
	Glu	Glu	Thr	Ile	Ser	Thr	Val	Gln	Glu	Lys	Gln	Gln	Asn	Ile	Ser	Pro
				100					105					110		
40	Leu	Val	Arg	Glu	Arg	Gly	Pro	Gln	Arg	Val	Ala	Ala	His	Ile	Thr	Gly
			115					120					125			
	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Asn	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys	Asn	Glu
	130						135					140				
45	Lys	Ala	Leu	Gly	Arg	Lys	Ile	Asn	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly
	145				150						155					160
	His	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Val	Ile
				165						170					175	
50	His	Glu	Lys	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe	Arg	Phe
				180					185					190		
	Gln	Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Asn	Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln
				195				200					205			
	Tyr	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys
	210						215					220				
55	Ser	Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp	Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr
	225				230						235					240
	Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp	Arg	Ile
				245					250						255	
60	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Glu	His	Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His	Glu	Ala
				260					265					270		
65	Ser	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Gly							
			275					280								

<210> 2
 <211> 1042
 5 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <220>
 <221> características varias
 <222> 447
 10 <223> n = T o G
 <400> 2

```

tttcctcact gactataaaa gaatagagaa ggaagggctt cagtgaccgg ctgcctggct 60
gacttacagc agtcagactc tgacaggatc atggctatga tggaggtcca ggggggacct 120
agcctgggac agacctgcgt gctgacgtg atcttcacag tgetcctgca gtctctctgt 180
gtggctgtaa cttacgtgta ctttaccac gagctgaagc agatgcagga caagtactcc 240
aaaagtggca ttgcttggtt cttaaagaa gatgacagtt attgggacct caatgacgaa 300
gagagtatga acagcccctg ctggcaagtc aagtggcaac tccgtcagct cgttagaaag 360
atgatthtga gaacctctga ggaaaccatt tctacagttc aagaaaagca acaaaatatt 420
tctcccctag tgagagaaaag aggtccncag agagttagcag ctcacataac tgggaccaga 480
ggaagaagca acacattgtc ttctccaaac tccaagaatg aaaaggctct gggccgcaaa 540
ataaactcct gggaatcatc aaggagtggg cattcattcc tgagcaactt gcacttgagg 600
aatggggaac tggatcatca tgaaaaaggg ttttactaca tctattcca aacatacttt 660
cgatttcagg aggaaataaa agaaaacaca aagaacgaca aacaaatggt ccaatatatt 720
tacaataaca caagttatcc tgaccctata ttgttgatga aaagtgctag aaatagttgt 780
tgggtctaaag atgcagaata tggactctat tccatctatc aagggggaat atttgagctt 840
aaggaaaatg acagaattht tgtthtctgta acaaatgagc acttgataga catggacct 900
gaagccagtt thttcggggc thttthtagtt ggctaactga cctggaaaga aaaagcaata 960
acctcaaagt gactattcag thttcaggat gatacactat gaagatgtht caaaaaatct 1020
gaccaaaca aacaaacaga aa
1042
  
```

REIVINDICACIONES

1. Método de recuperación de Apo2L/TRAIL de una mezcla que comprende
 - 5 (a) cargar la mezcla en una columna de intercambio catiónico;
 - (b) lavar la columna de intercambio catiónico con un tampón de equilibrio, mediante el cual se eliminan los componentes no unidos presentes en la mezcla;
 - (c) eluir el Apo2L/TRAIL unido a la columna de intercambio catiónico con un tampón de elución;
 - 10 (d) enfriar gradualmente el eluato hasta una temperatura de aproximadamente 2 a 4°C utilizando una velocidad de enfriamiento no lineal para mantener un nivel de supersaturación constante a medida que progresa la cristalización, mediante lo cual el Apo2L/TRAIL precipita espontáneamente en una forma cristalina para producir una mezcla de aguas madre y cristales de Apo2L/TRAIL, y
 - (e) recuperar Apo2L/TRAIL de la mezcla obtenida en la etapa (d) en una pureza de por lo menos aproximadamente el 99%.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que la mezcla cargada en la columna de intercambio catiónico es un medio de cultivo o lisato celular de células productoras de Apo2L/TRAIL.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, en el que dicha mezcla es el lisato celular de células huésped de E. coli productoras de Apo2L/TRAIL.
4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho lisato se aclara antes de cargarse en la columna de intercambio catiónico.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, en el que el eluato obtenido en la etapa (c) se somete a la etapa de cristalización de (d) sin purificación adicional.
6. Método según la reivindicación 1, en el que la columna de intercambio catiónico es una columna SP-Sefarosa.
- 30 7. Método según la reivindicación 6, en el que el pH de la mezcla cargada en dicha columna es o se ajusta a aproximadamente 7,5.
8. Método según la reivindicación, en el que la elución de Apo2L/TRAIL se realiza en un tampón de elución que comprende NaCl 100-200 mM o Na₂SO₄ 100-150 mM en un tampón que ajusta el pH a 7,5-7,8.
- 35 9. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa (d) el eluato se enfría desde una temperatura de aproximadamente 15 a 30°C hasta una temperatura de aproximadamente 2 a 8 °C en aproximadamente 1 a 60 horas.
- 40 10. Método según la reivindicación 9, en el que en la etapa (d) el eluato se enfría hasta una temperatura de aproximadamente 2 a 8°C en aproximadamente 1 a 8 horas.
11. Método según la reivindicación 9, en el que en la etapa (d) el eluato se enfría hasta una temperatura de aproximadamente 2 a 8°C en aproximadamente 1 hora.
- 45 12. Método según la reivindicación 11, en el que en la etapa (d) el eluato se enfría hasta una temperatura de aproximadamente 4°C en aproximadamente 1 hora.
13. Método según la reivindicación 1, en el que el pH del eluato es o se ajusta a pH 7,0-8,0 antes de la cristalización.
- 50 14. Método según la reivindicación 13, en el que el pH del eluato es o se ajusta a aproximadamente 7,3 antes de la cristalización.
15. Método según la reivindicación 13, en el que el pH del eluato es o se ajusta a aproximadamente 7,5-8,0 después de la cristalización.
- 55 16. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa (d) la temperatura de aproximadamente 2 a 4°C se mantiene hasta que se consigue o casi se consigue la solubilidad en equilibrio de Apo2L/TRAIL.
- 60 17. Método según la reivindicación 16, en el que en la etapa (d) la solubilidad de Apo2L/TRAIL disminuye mediante la adición de un antidisolvente.
18. Método según la reivindicación 17, en el que dicho antidisolvente se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), MPD, etanol, isopropanol, y dioxano.

65

19. Método según la reivindicación 18, en el que el peso molecular del PEG se encuentra entre aproximadamente 400 y aproximadamente 10.000 daltons.
- 5 20. Método según la reivindicación 19, en el que el peso molecular del PEG es 400, 3.350 ó 10,000 daltons.
21. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa (e) se recupera Apo2L/TRAIL en forma de cristales separados de las aguas madre mediante filtración o centrifugación o una combinación de los mismos.
- 10 22. Método según la reivindicación 21, en el que el pH de las aguas madre se ajusta a aproximadamente 8,0 antes de la filtración para disminuir la solubilidad.
23. Método según la reivindicación 1, que comprende además las etapas de disolver los cristales de Apo2L/TRAIL obtenidos en la etapa (d) y someter la solución obtenida a una segunda etapa de purificación cromatográfica.
- 15 24. Método según la reivindicación 23, en el que dicha segunda etapa de purificación cromatográfica es cromatografía de interacción hidrofóbica.
- 20 25. Método según la reivindicación 24, en el que la cromatografía de interacción hidrofóbica se realiza en una columna de Fenil-Sefarosa.
26. Método según la reivindicación 23, en el que dicha segunda etapa de purificación cromatográfica es una cromatografía de intercambio catiónico.
- 25 27. Método según la reivindicación 26, en el que dicha cromatografía de intercambio catiónico se realiza en una columna CM-Sefarosa o SP Sefarosa.
28. Método según la reivindicación 23, en el que el Apo2L/TRAIL se recupera y se formula después de dicha segunda etapa de purificación cromatográfica mediante ultrafiltración-diafiltración.
- 30 29. Método según la reivindicación 1, en el que dicha pureza es por lo menos aproximadamente del 99,5%.
30. Método según la reivindicación 1, en el que dicha pureza es por lo menos aproximadamente del 99,9%.

1 TTTCTCTACTATAAAAGAATAGAGAAAGGAGGGCTTCAGTGACCGGGCTCGCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGATC
2 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGACCCAGCCCTGGGACAGACCTGGCTGATCGTGTGATCTTTCACAGTGGCTCCTCGCAGTCTCTCTGT
3 MetAlaMetMetGluValGlnGlyGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys
181 GTGGCTGTAACCTTAGGTACTTTACCAAGGAGCTGAAGCAGATGCGACAGACTCCAAAAGTGGCAATTCCTTCTTAAAAAGAA
31 ValAlaValThrValThrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPyeLeuL6sGlu
271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAAGAGATATGAACAGCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAGCTCGTTAGAAAAG
61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
361 ATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCAITTTCTACAGTTCAAGAAAAGCAACAAAATATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAAGAGGTCCNCAG
91 MetIleLeuArgThrSerGluGlnThrIleSerThrValGlnGlnLysGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
451 AGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACCAGAGGAAGCAACACATTTCTCCAAACTCCAAGAAATGAAAAGGCTCTGGGCCGCAAA
121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
541 ATAAACTCCTGGGAATCAACAAGGAGTGGCAITTCATTCCTGAGCAACTTGCACCTTGAGGAATGGTCAACTGCCATGAAAAGGG
151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly
631 TTTTACTACATCTATCCCAACATACCTTTGGATTTCAGGAGGAAATAAAAGAAAACACAAAGAACCAAAATGGTCCCAATATATT
181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
721 TACAAATACACAAGTTATCCTGACCCCTATATTGTTGATGAAAAGTCTAGAAAATAGTTTGGTCTAAAGATGCAGAAATATGGACTCTAT
211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr
811 TCCATCTACAAGGGGAAATATTTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAAATTTTGTTCGTAAACAAAATCAGCAGCTTGATAGACATGGACCAT
241 SerIleTyrGlnGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
901 GAAGCCAGTTTTTCGGGGCCTTTTAGTTGGCTAACTGACCTGGAAAAGAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTCAGTTTTTCAGGAT
271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp
991 GATACACTATGAAGATGTTTCAAATAAAATCTGACCAAAAACAAAACACAGAAA

FIG. 1

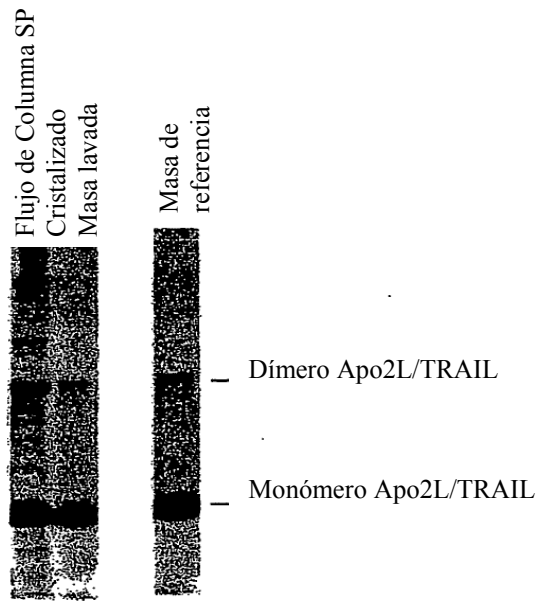


FIG. 2

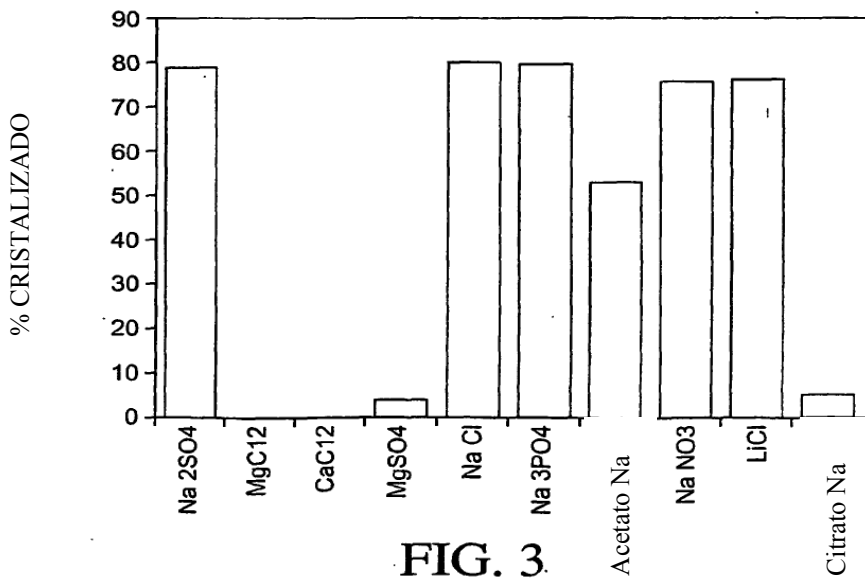


FIG. 3

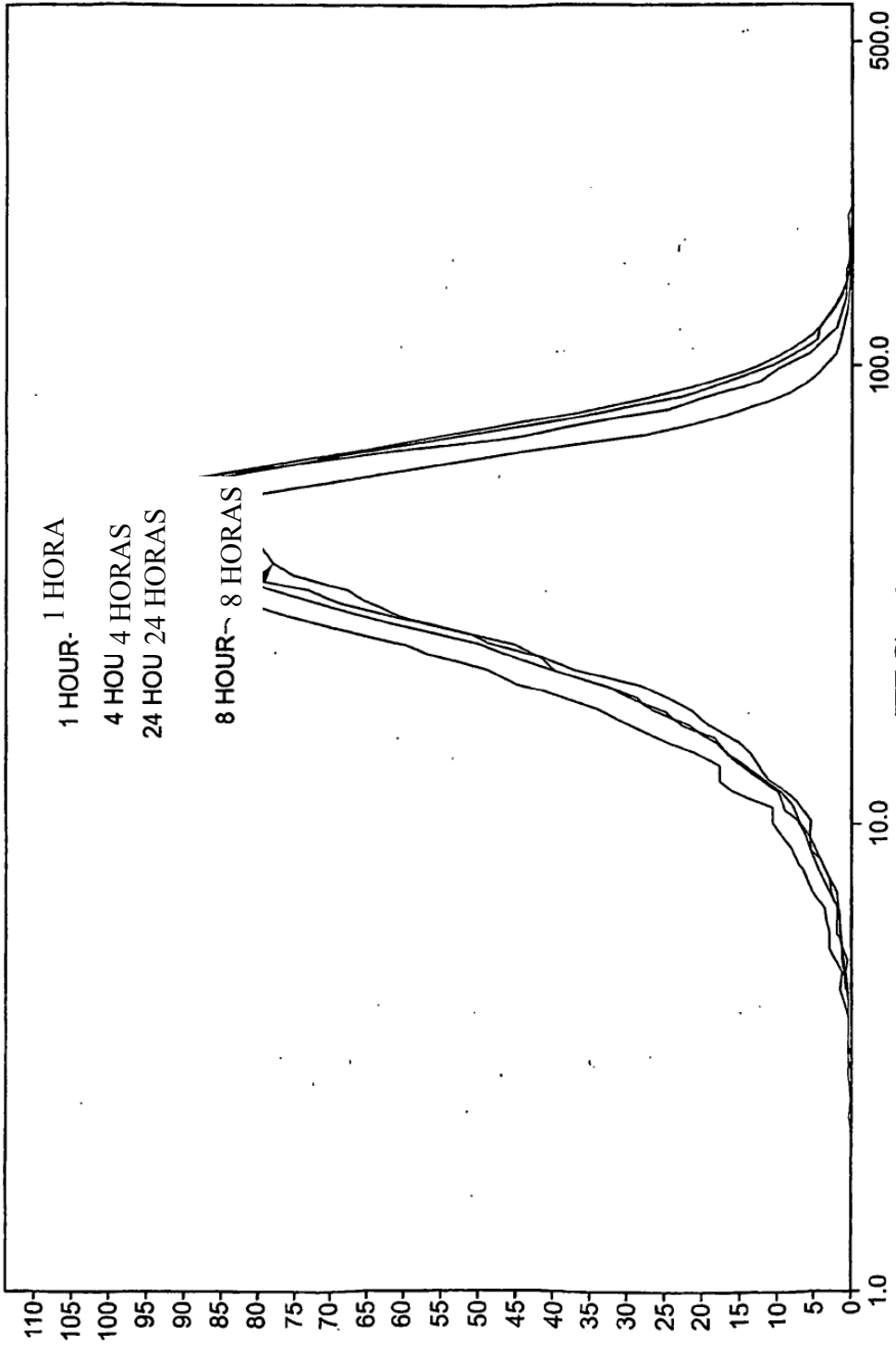


FIG. 4

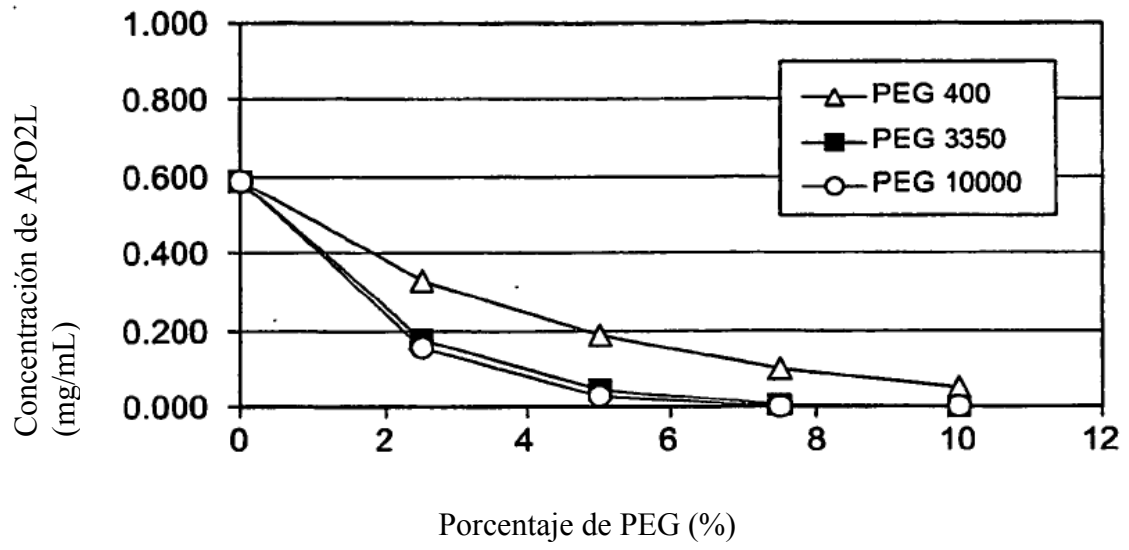


FIG. 5