



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 786**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/19** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02784443 .0**  
96 Fecha de presentación : **12.11.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1450847**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2004**

54 Título: **Formulaciones con ligando Apo2/TRAIL y usos de las mismas.**

30 Prioridad: **13.11.2001 US 338249 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.02.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.02.2011**

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**  
**1 Dna Way**  
**South San Francisco, California 94080-4, US**

72 Inventor/es: **Shahrokh, Zahra;**  
**Lin, Tanya, P.;**  
**Matthews, Timothy, C.;**  
**Flores, Heather y**  
**Pai, Roger**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 351 786 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

[0001] La presente invención se refiere en general a formulaciones de Apo2L/TRAIL. En particular, dichas formulaciones de Apo2L/TRAIL incluyen composiciones liofilizadas y cristalinas.

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Se han identificado diferentes moléculas, tales como el factor de necrosis tumoral alfa ("TNF-alfa"), factor de necrosis tumoral beta ("TNF-beta" o "linfotoxina-alfa"), linfotoxina-beta ("LT-beta"), ligando CD30, ligando CD27, ligando CD40, ligando OX-40, ligando 4-1BB, ligando Apo-1 (también denominado ligando Fas o  
10 ligando CD95), ligando Apo-2(también denominado ligando Apo2L o TRAIL), ligando Apo-3 (también denominado TWEAK), APRIL, ligando OPG (también denominado ligando RANK , ODF, o TRANCE), y TALL-1 (también denominado BlyS, BAFF o THANK), como miembros de la familia de factores de necrosis tumoral ("TNF") de las citocinas [Véase, p. ej., Gruss y Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995);  
15 Schmid y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry y col., *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987); Pitti y col., *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley y col., *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning y col., *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage y col. *Nature*, 357:80-82 (1992), documento WO 97/01633 publicado el 16 de enero, 1997; documento WO 97/25428 publicado el 17 de julio, 1997; Marsters y col., *Curr.*  
20 *Biol.*, 8:525-528 (1998); Chicheportiche y col., *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Hahne y col., *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); documento WO98/28426 publicado el 2 de julio, 1998; documento WO98/46751 publicado el 22 de octubre, 1998; documento WO/98/18921 publicado el 7 de mayo, 1998; Moore y col., *Science*, 285:260-263 (1999); Shu y col., *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); Schneider y col., *J.*  
25 *Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay y col., *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999)]. Entre estas moléculas, se ha descrito que están implicados en la muerte celular apoptótica TNF-alfa, TNF-beta, ligando CD30, ligando 4-1BB, ligando Apo-1, ligando Apo-2 (Apo2L/TRAIL) y ligando Apo-3 (TWEAK).

[0003] Apo2L/TRAIL se ha identificado hace varios años como un miembro de la  
30 familia de TNF de las citocinas [véase, p. ej., Wiley y col., *Immunity*, 3:673-682 (1995); Pitti y col., *J. Biol. Chem.*, 271:12697-12690 (1996)]. El polipéptido Apo2L/TRAIL humano de longitud entera es una proteína transmembranal de tipo II de 281 aminoácidos de longitud. Algunas células pueden producir una forma soluble natural del polipéptido, por escisión enzimática de la región extracelular del  
35 polipéptido [Mariani y col., *J. Cell. Biol.*, 137:221-229 (1997)]. Los estudios

cristalográficos de las formas solubles de Apo2L/TRAIL ponen de manifiesto una estructura homotrímica similar a las estructuras del TNF y otras proteínas relacionadas [Hymowitz y col., *Molec. Cell*, 4:563-571 (1999); Hymowitz y col., *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)]. Sin embargo, se encontró que Apo2L/TRAIL, a diferencia de  
 5 otros miembros de la familia de los TNF, tiene una característica estructural única en cuanto que tiene 3 restos de cisteína (en la posición 230 de cada subunidad del homotrímico) que se coordinan juntos con un átomo de cinc, y que la unión al cinc es importante para la estabilidad del trímico y la actividad biológica [Hymowitz y col., véase antes; Bodmer y col., *J. Biol. Chem.*, 275:20632-20637 (2000)].

10 **[0004]** Se ha descrito en la bibliografía que Apo2L/TRAIL puede tener una función en la modulación del sistema inmunitario, incluyendo enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide, y en el tratamiento del VIH [véase, p. ej., Thomas y col., *J. Immunol.*, 161:2195-2200 (1998); Johnsen y col., *Cytokine*, 11:664-672 (1999); Griffith y col., *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353 (1999); Song y col., *J.*  
 15 *Exp. Med.*, 191:1095-1103 (2000); Jeremias y col., *Eur. J. Immunol.*, 28:143-152 (1998); Katsikis y col., *J. Exp. Med.*, 186:1365-1372 (1997); Miura y col., *J. Exp. Med.*, 193:651-660 (2001)].

**[0005]** También se ha descrito que formas solubles de Apo2L/TRAIL inducen apoptosis en una variedad de células de cáncer in vitro, incluyendo tumores de colon,  
 20 pulmón, mama, próstata, vejiga, riñón, ovario y cerebro, así como melanoma, leucemia y mieloma múltiple [véase, p. ej., Wiley y col., véase antes; Pitti y col., véase antes; Rieger y col., *FEBS Letters*, 427:124-128 (1998); Ashkenazi y col., *J. Clin. Invest.*, 104:155-162 (1999); Walczak y col., *Nature Med.*, 5:157-163 (1999); Keane y col., *Cancer Research*, 59:734-741 (1999); Mizutani y col., *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612  
 25 (1999); Gazitt, *Leukemia*, 13: 1817-1824 (1999); Yu y col., *Cancer Res.*, 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1754-1759 (2000)]. Estudios in vivo en modelos de tumores murinos sugieren además que Apo2L/TRAIL, solo o en combinación con quimioterapia o terapia de radiación, puede ejercer sustanciales efectos antitumorales [véase, p. ej., Ashkenazi y col., véase antes;  
 30 Walczak y col., véase antes; Gliniak y col., *Cancer Res.*, 59:6153-6158 (1999); Chinnaiyan y col., véase antes; Roth y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265:1999 (1999)]. A diferencia de muchos tipos de células de cáncer, parece que la mayoría de los tipos de células humanas normales son resistentes a la inducción de la apoptosis por determinadas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL [Ashkenazi y col., véase  
 35 antes; Walczak y col., véase antes]. Jo y col. han descrito que una forma soluble de

- Apo2L/TRAIL marcada con polihistidina inducía apoptosis in vitro en hepatocitos humanos normales aislados, pero no en los no humanos [Jo y col., *Nature Med.*, 6:564-567 (2000); véase también, Nagata, *Nature Med.*, 6: 502-503 (2000)]. Se cree, que determinadas preparaciones de Apo2L/TRAIL recombinante, pueden variar en
- 5 términos de propiedades bioquímicas y actividades biológicas en células enfermas frente a normales, dependiendo, por ejemplo, de la presencia o ausencia de una molécula marcada, contenido de cinc y contenido de % de trímero [Véase, Lawrence y col., *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:383-385 (2001); Qin y col., *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:385-386 (2001)].
- 10 **[0006]** Se cree que la inducción de diferentes respuestas celulares mediadas por dicha familia de TNF de citocinas, es iniciada por la unión a sus receptores celulares específicos. Previamente, se identificaron dos receptores de TNF distintos de aproximadamente 55-kDa (TNFR1) y 75- kDa (TNFR2) [Hohman y col., *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934 (1989); Brockhaus y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3127-
- 15 3131 (1990); documento EP 417.563, publicado el 20 de marzo, 1991; Loetscher y col., *Cell*, 61:351 (1990); Schall y col., *Cell*, 61:361 (1990); Smith y col., *Science*, 248:1019-1023 (1990); Lewis y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:2830-2834 (1991); Goodwin y col., *Mol. Cell. Biol.*, 11:3020-3026 (1991)]. Se encontró que esos TNFR compartían la estructura típica de los receptores de superficie celular incluyendo las
- 20 regiones extracelular, transmembranal e intracelular. Las partes extracelulares de ambos receptores se encontraron también de forma natural como proteínas de unión al TNF solubles. [Nophar, Y. y col., *EMBO J.*, 9:3269 (1990); and Kohno, T. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:8331 (1990); Hale y col., *J. Cell. Biochem. Suplemento 15F*, 1991, pág. 113 (P424)].
- 25 **[0007]** La parte extracelular del tipo 1 y 2 de TNFR (TNFR1 y TNFR2) contiene un patrón repetido de secuencia de aminoácidos de 4 dominios (CRD) ricos en cisteína designados de 1 a 4, empezando por el extremo NH<sub>2</sub>. [Schall y col., véase antes; Loetscher y col., véase antes; Smith y col., véase antes; Nophar y col., véase antes; Kohno y col., véase antes; Banner y col., *Cell*, 73:431-435 (1993)]. Existe un patrón de
- 30 CRD repetitivo similar en varias otras proteínas de superficie celular, incluyendo el receptor del factor de crecimiento de nervios p75 (NGFR) [Johnson y col., *Cell*, 47:545 (1986); Radeke y col., *Nature*, 325:593 (1987)], el antígeno CD40 de células B [Stamenkovic y col., *EMBO J.*, 8:14.03 (1989)], el antígeno OX40 de células T [Mallet y col., *EMBO J.*, 9: 1063 (1990)] y el antígeno Fas [Yonehara y col., véase antes y Itoh
- 35 y col., *Cell*, 66:233-243 (1991)]. Los CRD también se encuentran en las proteínas T2

de tipo TNFR soluble (sTNFR) de los virus de Shope y poxvirus mixoma [Upton y col., *Virology*, 160:20-29 (1987); Smith y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176:335 (1991); Upton y col., *Virology*, 184:370 (1991)]. El alineamiento óptimo de estas secuencias indica que las posiciones de los restos de cisteína están bien conservadas. Estos receptores se denominan a veces colectivamente miembros de la superfamilia de receptores de TNF/NGF.

**[0008]** Los ligandos de la familia de TNF identificados hasta la fecha, con la excepción de la linfotoxina beta, son típicamente proteínas transmembranales de tipo II, cuyo extremo C-terminal es extracelular. En contraposición, la mayoría de los receptores en la familia de receptores de TNF (TNFR) identificados hasta la fecha, son típicamente proteínas transmembranales de tipo I. Sin embargo, tanto en las familias de ligandos como en la de receptores de TNF, se ha encontrado homología identificada entre miembros de la familia, principalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Algunas de las citocinas de la familia de TNF, incluyendo TNF-alfa, ligando Apo-1 y ligando CD40, son escindidas proteolíticamente en la superficie celular; y la proteína resultante en cada caso típicamente forma una molécula homotrímica que funciona como una citocina soluble. Las proteínas de la familia de receptores de TNF normalmente también son escindidas proteolíticamente para liberar los ECD del receptor soluble que pueden funcionar como inhibidores de las citocinas cognadas.

**[0009]** Pan y col. han descrito otro miembro de la familia de receptores de TNF denominado "DR4" [Pan y col., *Science*, 276: 111-113 (1997); véase también el documento WO98/32856 publicado el 30 de julio, 1998]. Se ha descrito que DR4 contenía un dominio de muerte citoplasmática capaz de conectar el aparato de suicidio celular. Pan y col. describen que se cree que DR4 es un receptor para el ligando conocido como Apo2L/TRAIL.

**[0010]** En Sheridan y col., *Science*, 277:818-821 (1997) y Pan y col., *Science*, 277:815-818 (1997), se describe otra molécula que se cree que es un receptor para Apo2L/TRAIL [véase también, documento WO98/51793 publicado el 19 de noviembre, 1998; documento WO98/41629 publicado el 24 de septiembre, 1998]. Esta molécula se denomina DR5 (también se ha denominado alternativamente Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER [Screaton y col., *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak y col., *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu y col., *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); documento WO98/35986 publicado el 20 de agosto, 1998; documento EP870.827 publicado el 14 de octubre, 1998; documento WO98/46643 publicado el 22 de octubre, 1998; documento WO99/02653 publicado el

21 de enero, 1999; documento WO99/09165 publicado el 25 de febrero, 1999; documento WO99/1179 publicado el 11 de marzo, 1999]. Al igual que DR4, se describe que DR5 contiene un dominio de muerte citoplasmática y es capaz de señalar la apoptosis. La estructura cristalina del complejo formado entre Apo-  
5 2L/TRAIL y DR5 se describe en Hymowitz y col., *Molecular Cell*, 4:563-571 (1999).

**[0011]** Otro grupo de receptores identificados recientemente se denominan “receptores señuelo”, se cree que funcionan como inhibidores, más que transductores, de la señalización. Este grupo incluye DCR1 (también denominado TRID, LIT o TRAIL-R3) [Pan y col., *Science*, 276:111-113 (1997); Sheridan y col., *Science*,  
10 277:818-821 (1997); McFarlane y col., *J. Biol. Chem.*, 272:25417-25420 (1997); Schneider y col., *FEBS Letters*, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti y col., *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); y Mongkolsapaya y col., *J. Immunol.*, 160:3-6 (1998)] y DCR2 (también denominado TRUNDD o TRAIL-R4) [Marsters y col., *Curr. Biol.*,  
7:1003-1006 (1997); Pan y col., *FEBS Letters*, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti y col.,  
15 *Immunity*, 7:813-820 (1997)], ambas moléculas de superficie celular, así como OPG [Simonet y col., véase antes; Emery y col., véase a continuación] y DCR3 [Pitti y col., *Nature*, 396:699-703 (1998)], que son ambas proteínas solubles, secretadas. Se ha descrito que Apo2L/TRAIL se une a los receptores denominados DcR1, DcR2 y OPG.

**[0012]** Se cree que Apo2L/TRAIL actúa a través de los “receptores de muerte”  
20 DR4 y DR5 de la superficie celular para activar caspasas o enzimas que llevan a cabo el programa de muerte celular. Tras la unión del ligando, tanto DR4 como DR5 pueden desencadenar la apoptosis independientemente, reclutando y activando el iniciador de apoptosis, caspasa-8, por la molécula adaptadora que contiene el dominio de muerte denominada FADD/Mort1 [Kischkel y col., *Immunity*, 12:611-620 (2000); Sprick y  
25 col., *Immunity*, 12:599-609 (2000); Bodmer y col., *Nature Cell Biol.*, 2:241-243 (2000)]. A diferencia de DR4 y DR5, los receptores DcR1 y DcR2 no señalizan apoptosis.

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

#### **RESUMEN DE LA INVENCION**

**[0014]** Algunas proteínas, tales como Apo2L/TRAIL y otros miembros de la  
35 familia de TNF de citocinas, presentan actividad biológica cuando la proteína está

como trímero o forma trimérica. Por lo tanto, para propósitos de uso terapéutico o incluso de diagnóstico, se desean formulaciones de dichas proteínas en las que la proteína sea estable y permanezca biológicamente activa, en particular estable en una forma de trímero. Los autores de la invención han encontrado que determinados  
5 componentes de formulación o “excipientes”, pueden proporcionar estabilidad para proteínas tales como Apo2L/TRAIL y potenciar la solubilidad (es decir, reducir la agregación o precipitación de la proteína). Los autores de la invención también han encontrado sorprendentemente que, en determinadas condiciones, Apo2L/TRAIL puede cristalizar fácilmente. Dichas formas cristalinas de Apo2L/TRAIL pueden ser  
10 útiles en la preparación de formulaciones en suspensión de Apo2L/TRAIL y/o proporcionar un procedimiento eficaz y eficiente para la purificación de proteínas.

**[0015]** Por consiguiente, la presente invención proporciona formulaciones estables que comprenden APO2L/TRAIL y uno o más excipientes, que proporcionan suficiente fuerza iónica para potenciar la solubilidad y/o estabilidad de APO2L/TRAIL, en las  
15 que la composición tiene un pH de 6 (o aproximadamente 6) a 9 (o aproximadamente 9). En las formulaciones reivindicadas, el o los excipientes que proporcionan suficiente fuerza iónica son una sal de arginina o sal de sulfato. En una realización, las composiciones pueden comprender además un tampón. Opcionalmente, la concentración de la proteína APO2L/TRAIL en la composición es de  
20 aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/ml, o aproximadamente 20 mg/ml. Las composiciones de la invención pueden comprender formulaciones líquidas o formulaciones liofilizadas. Las composiciones también pueden comprender formulaciones en suspensión en las que la proteína  
25 APO2L/TRAIL está en forma de cristales. Opcionalmente, puede ser conveniente incluir uno o más tensioactivos en la composición. Dichos tensioactivos pueden comprender, por ejemplo, un polisorbato o poloxámero. Las formulaciones particularmente deseadas son aquellas en las que el o los excipientes proporcionan el contenido de trímero de APO2L/TRAIL optimizado y minimizan la cantidad de  
30 dímero de APO2L/TRAIL o formación de agregados. Opcionalmente, las formulaciones no contienen más de 10% de dímero de Apo2L/TRAIL o 5% de agregados de Apo2L/TRAIL (de la cantidad total de proteína APO2L/TRAIL en la formulación).

**[0016]** En realizaciones opcionales, la presente invención proporciona  
35 composiciones que comprenden de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/ml

de APO2L/TRAIL y sal de arginina, en las que la composición tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5. Opcionalmente, las composiciones comprenden además un tampón tal como Tris y un tensioactivo tal como polisorbato. Opcionalmente, la proteína APO2L/TRAIL no incluye (es decir, no está unida o fusionada con) ninguna molécula(s) marcadora(s) de epítipo o moléculas(s) con cremallera de leucina.

**[0017]** La presente invención proporciona composiciones que comprenden APO2L/TRAIL de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/ml, sal de arginina de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5 M y tampón, en las que las composiciones tienen un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. La proteína APO2L/TRAIL puede ser proteína APO2L/TRAIL humana que comprende los restos de aminoácidos 114 a 281 de la figura 1. Opcionalmente, la proteína APO2L/TRAIL se expresa de forma recombinante en células hospedadoras tales como *E. coli*.

**[0018]** Además, la invención proporciona procedimientos para preparar las composiciones descritas antes. En los procedimientos, las composiciones se preparan mezclando o combinando APO2L/TRAIL y uno o más excipientes que proporcionan suficiente fuerza iónica para potenciar la solubilidad y/o estabilidad de la APO2L/TRAIL, en los que las composiciones tienen un pH de 6 (o aproximadamente 6) a 9 (o aproximadamente 9). En las formulaciones el o los excipientes que proporcionan suficiente fuerza iónica son una sal de arginina o sal de sulfato. También se puede incluir un tampón para mantener el pH de la composición, y opcionalmente para mantener el pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. Opcionalmente, la concentración de la proteína APO2L/TRAIL en la formulación es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/ml, o al menos 20 mg/ml. En realizaciones particularmente deseables, las composiciones resultantes son formulaciones farmacéuticamente aceptables.

**[0019]** En realizaciones adicionales, la invención proporciona kits que comprenden:

(a) un envase que comprende una composición de APO2L/TRAIL descrita en el presente documento, y

(b) instrucciones para usar la composición de APO2L/TRAIL; tal como para usar la composición para tratar un trastorno contra el que la composición es eficaz. Opcionalmente, el trastorno es cáncer, y más en particular, es un cáncer de

mama, pulmón o colon (colorrectal).

**[0020]** En otros aspectos adicionales, la invención proporciona las formulaciones reivindicadas para usar en el tratamiento de un trastorno, tal como el cáncer o un trastorno inmunitario relacionado.

- 5 **[0021]** En realizaciones más particulares de la invención, se proporciona lo siguiente:

Una formulación estable de ligando Apo-2, que comprende ligando Apo-2 y sal en aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, en la que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9. Opcionalmente,  
10 la sal es una sal de arginina o sulfato de sodio. Opcionalmente, la concentración de la sal de arginina en la formulación es de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,5 M. La sal de arginina puede incluir succinato de arginina, sulfato de arginina, malato de arginina, citrato de arginina, tartrato de arginina o fosfato de arginina. El ligando Apo-2 puede comprender opcionalmente proteína cristalizada. La formulación  
15 puede comprender una formulación liofilizada o en suspensión. Opcionalmente, el pH de la formulación es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, y opcionalmente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Opcionalmente, la formulación comprende además tensioactivo, tal como un polisorbato o poloxámero. Opcionalmente, la concentración del tensioactivo en la formulación es de  
20 aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,2%. Opcionalmente, la formulación comprende además tampón, tal como tampón de Tris o Hepes. Opcionalmente, la formulación comprende además uno o más iones metálicos divalentes o un conservante. Opcionalmente, la formulación es estable al almacenamiento durante al menos 12 meses.

- 25 **[0022]** Una formulación estable liofilizada de ligando Apo-2 comprende ligando Apo-2 de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, sal de arginina de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, tampón y tensioactivo, en el que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9. Opcionalmente, la sal de arginina es succinato de arginina y la concentración del  
30 succinato de arginina puede ser de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,5 M. Opcionalmente, el tampón es tampón de Tris y el tensioactivo es un polisorbato. Opcionalmente, la formulación comprende además uno o más iones metálicos divalentes.

- [0023]** Una formulación estable de ligando Apo-2, comprende ligando Apo-2 de  
35 aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, sulfato sódico de

aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, tampón y tensioactivo, en la que dicho ligando Apo-2 comprende proteína cristalizada y dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9. Opcionalmente, el tampón es tampón de Tris. Opcionalmente, el tensioactivo es polisorbato y el pH es de aproximadamente 7 a 5 aproximadamente 7,5.

**[0024]** Un procedimiento para hacer una formulación estable de ligando Apo-2, comprende las etapas de (a) proporcionar ligando Apo-2 de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, sal de arginina o sulfato sódico de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, tampón y tensioactivo, (b) combinar o mezclar los 10 ingredientes de la etapa (a) para hacer una formulación, y (c) ajustar el pH de la formulación de la etapa (b) de aproximadamente 6 a aproximadamente 9. Opcionalmente, la sal de arginina es succinato de arginina, y la concentración del succinato de arginina es de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,5 M. Opcionalmente, el tampón es tampón de Tris y el tensioactivo es un polisorbato.

15 **[0025]** Un dispositivo para administrar una formulación de ligando Apo-2 a un mamífero, que comprende un envase que contiene al menos una unidad de dosificación de formulaciones de ligando Apo-2 descritas en el presente documento. Opcionalmente, el dispositivo es un dispositivo inyector de tipo bolígrafo y el envase es un cartucho.

20 **[0026]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento in vitro para inducir la apoptosis en células de mamífero, que comprende exponer las células de mamífero a una cantidad eficaz de una formulación de ligando Apo-2. Las células de mamífero pueden ser células de cáncer.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

25 **[0027]**

**Figura 1.** Muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de Apo-2L/TRAIL humana (SEQ ID NO: 2) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO: 1). La “N” en la posición 447 de los nucleótidos (en el SEQ ID NO: 2) se usa para indicar que la base de nucleótido puede ser “T” o “G”.

30 **Figura 2.** Muestra los datos (% de trímero que queda y % del pico principal de IEX que queda) para diferentes formulaciones de Apo2L/TRAIL después de 1 semana de almacenamiento a 30°C.

**Figura 3A.** Muestra los datos (% de trímero que queda y % del pico principal de IEX que queda) para diferentes formulaciones de 35 Apo2L/TRAIL después de 4 meses de almacenamiento a 40°C.

**Figura 3B.** Muestra los datos (% de trímero que queda, % de monómero y % del pico principal de IEX que queda) para diferentes formulaciones de Apo2L/TRAIL después de 1 mes de almacenamiento a 50°C.

5 **Figura 3C.** Muestra una gráfica de Arrhenius que predice la vida en almacenamiento de la formulación de Apo2L/TRAIL descrita.

**Figuras 4A-4B.** Muestran gráficas del porcentaje de bioactividad y del porcentaje de trímero de dos formulaciones diferentes con diversos pH.

**Figura 5.** Ilustra la estructura de Apo2L/TRAIL y coordinación de la estructura por una molécula de cinc intrínseca.

10 **Figura 6.** Muestra los efectos de diferentes concentraciones de polisorbato en la estabilidad de una formulación de Apo2L/TRAIL.

**Figura 7.** Muestra los efectos de diferentes concentraciones de cinc en la estabilidad de una formulación de Apo2L/TRAIL.

15 **Figura 8.** Muestra la solubilidad en equilibrio y la cristalización de Apo2L/TRAIL en una formulación de sulfato de sodio.

**Figura 9.** Muestra la solubilidad en equilibrio y la cristalización de Apo2L/TRAIL en diferentes concentraciones de sal.

**Figura 10A.** Muestra los efectos de las velocidades de agitación en la cristalización de Apo2L/TRAIL.

20 **Figura 10B.** Muestra el perfil de disolución de cristales de Apo2L/TRAIL con agitación.

**Figura 10C.** Muestra los efectos de la velocidad de agitación en la distribución del tamaño de cristales de Apo2L/TRAIL.

25 **Figura 11A.** Muestra el perfil de IEX de Apo2L/TRAIL después de reconstitución de cristales secados a vacío.

**Figura 11B.** Muestra la bioactividad de Apo2L/TRAIL después de reconstitución de los cristales secados a vacío.

**Figura 12.** Muestra una gráfica de Arrhenius que predice la vida en almacenamiento de la formulación de Apo2L/TRAIL descrita.

30 **Figura 13.** Muestra el gel teñido con plata de SDS-PAGE que ilustra la pureza de las preparaciones de Apo2L/TRAIL descritas.

**Figura 14.** Muestra los efectos de diferentes sales en la cristalización de Apo2L/TRAIL.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### 35 A. Definiciones

**[0028]** “Miembro de la familia de TNF” se usa en un sentido amplio para referirse a diferentes polipéptidos que comparten similitud con el factor de necrosis tumoral (TNF) con respecto a la estructura o la función. En la técnica se conocen algunas características estructurales y funcionales asociadas con la familia de polipéptidos de TNF, y se describen por ejemplo, en los Antecedentes de la invención, anteriores. Dichos polipéptidos incluyen, pero sin limitar, los polipéptidos a los que se hace referencia en la técnica TNF-alfa, TNF-beta, ligando CD40, ligando CD30, ligando CD27, ligando OX-40, ligando 4-1BB, ligando Apo-1 (también denominado ligando Fas o ligando CD95), Apo-2L/TRAIL (también denominado TRAIL), ligando Apo-3 (también denominado TWEAK), APRIL, ligando OPG (también denominado ligando RANK, ODF, o TRANCE), y TALL-1 (también denominado BlyS, BAFF o THANK) (Véase, p. ej., Gruss y Dower, *Blood* 1995, 85:3378-3404; Pitti y col., *J. Biol. Chem.* 1996, 271:12687-12690; Wiley y col., *Immunity* 1995, 3:673-682; Browning y col., *Cell* 1993, 72:847-856; Armitage y col. *Nature* 1992, 357: 80-82, publicaciones PCT n° WO 97/01633; y WO 97/25428; Marsters y col., *Curr. Biol.* 1998, 8:525-528; Chicheportiche y col., *Biol. Chem.* 1997, 272:32401-32410; Hahne y col., *J. Exp. Med.* 1998, 188:1185-1190; publicaciones PCT n° WO98/28426; WO98/46751; y WO/98/18921; Moore y col., *Science* 1999, 285:260-263; Shu y col., *J. Leukocyte Biol.* 1999, 65:680; Schneider y col., *J. Exp. Med.* 1999, 189:1747-1756; Mukhopadhyay y col., *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 15978-15981).

**[0029]** Los términos "Apo2L/TRAIL", "Apo2L", "ligando Apo-2" y "TRAIL" se usan en el presente documento para referirse a una secuencia de polipéptidos que incluye los restos de aminoácidos 114-281, inclusive, 95-281, inclusive, restos 92-281, inclusive, restos 91-281, inclusive, restos 41-281, inclusive, restos 15-281, inclusive, o restos 1-281, inclusive, de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), así como fragmentos biológicamente activos, variantes por delección, inserción o sustitución de las secuencias anteriores. En una realización, la secuencia de polipéptidos comprende los restos 114-281 de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), y opcionalmente consiste en los restos 114-281 de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, la secuencia del polipéptido comprende los restos 92-281 o restos 91-281 de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). Los polipéptidos Apo-2L pueden ser codificados por la secuencia de nucleótidos natural mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2). Opcionalmente, el codón que codifica el resto Pro119 (Figura 1; SEQ ID NO: 2) puede ser "CCT" o "CCG". En otras realizaciones, los fragmentos o variantes son biológicamente activos y tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al

menos aproximadamente 80%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 90%, e incluso más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con cualquiera de las secuencias de Apo2L/TRAIL citadas antes. Opcionalmente, el polipéptido Apo2L/TRAIL es codificado por una

5 secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones restrictivas con la secuencia de polinucleótidos codificante proporcionada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2). La definición abarca variantes por sustitución de Apo2L/TRAIL en las que al menos uno de sus aminoácidos nativo se sustituye por un resto alanina. Las variantes por sustitución particulares de Apo2L/TRAIL incluyen aquellas en las que al menos un

10 aminoácido se sustituye por un resto alanina. Estas variantes por sustitución incluyen las identificadas, por ejemplo, como "D203A"; "D218A" y "D269A." Esta nomenclatura se usa para identificar las variantes de Apo2L/TRAIL en las que los restos de ácido aspártico de las posiciones 203, 218, y/o 269 (usando la numeración mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1)) se sustituyen por restos de alanina.

15 Opcionalmente, las variantes de Apo2L pueden comprender una o más de las sustituciones de alanina que se citan en la Tabla I de la solicitud PCT publicada WO 01/00832. Las variantes por sustitución incluyen una o más sustituciones de restos identificados en la Tabla I del documento WO 01/00832 publicado el 4 de enero, 2001. La definición también abarca una secuencia natural de Apo2L/TRAIL aislada de una

20 fuente de Apo2L/TRAIL o preparada por procedimientos recombinantes o sintéticos. La Apo2L/TRAIL de la invención incluye los polipéptidos denominados Apo2L/TRAIL o TRAIL descritos en las publicaciones PCT n° WO97/01633 y WO97/25428. Los términos "Apo2L/TRAIL" o "Apo2L" se usan para referirse en general a formas de la Apo2L/TRAIL que incluyen formas de monómero, dímero o

25 trímero del polipéptido. Todas las numeraciones restos de de aminoácidos a las que se hace referencia en la secuencia de Apo2L usan la numeración según la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), salvo que se indique específicamente otra cosa. Por ejemplo, "D203" o "Asp203" se refieren al resto de ácido aspártico en la posición 203 en la secuencia proporcionada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1).

30 **[0030]** La expresión "dominio extracelular de Apo2L/TRAIL" o "ECD de Apo2L/TRAIL" se refiere a una forma de Apo2L/TRAIL que carece esencialmente de dominios transmembranales y citoplasmáticos. Normalmente, el ECD tendrá menos de 1% de dichos dominios transmembranales y citoplasmáticos, y preferiblemente tendrá menos de 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio o dominios

35 transmembranales identificados para los polipéptidos de la presente invención se

identifican siguiendo los criterios usados habitualmente en la técnica para identificar este tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembranal pueden variar, pero muy probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier de los extremos del dominio identificado inicialmente. En realizaciones 5 preferidas, el ECD consistirá en una secuencia de dominio extracelular soluble del polipéptido que carece de los dominios transmembranales y citoplasmáticos o intracelulares (y no está unido a membrana). Se describen secuencias de dominio extracelular particulares de Apo2L/TRAIL en las publicaciones PCT n° WO97/01633 y WO97/25428.

10 **[0031]** La expresión “monómero de Apo2L/TRAIL” o “monómero de Apo2L” se refiere a una cadena covalente de una secuencia del dominio extracelular de Apo2L.

**[0032]** La expresión “dímero de Apo2L/TRAIL” o “dímero de Apo2L” se refiere a dos monómeros de Apo-2L unidos en una unión covalente por un enlace disulfuro. La expresión como se usa en el presente documento, incluye dímeros de Apo2L que 15 están libres y dímeros de Apo2L que están dentro de formas de trímeros de Apo2L (es decir, asociada con otro tercer monómero de Apo2L).

**[0033]** La expresión “trímero de Apo2L/TRAIL” o “trímero de Apo2L” se refiere a 3 monómeros de Apo2L que están asociados de forma no covalente.

**[0034]** La expresión “agregado de Apo2L/TRAIL” se usa para referirse a formas 20 oligómeras superiores autoasociadas de Apo2L/TRAIL, tales como trímeros de Apo2L/TRAIL, que forma, por ejemplo, formas hexámeras y nanómeras de Apo2L/TRAIL.

**[0035]** La determinación de la presencia y cantidad de monómero, dímero o trímero (u otros agregados) de Apo2L/TRAIL se puede hacer usando procedimientos y 25 ensayos conocidos en la técnica (y usando materiales disponibles en el comercio), tales como HPLC de exclusión por tamaños (“SEC”) nativo, exclusión por tamaños desnaturizante usando dodecilsulfato sódico (“SDS-SEC”), HPLC de fase inversa, electroforesis capilar, e incluyendo los procedimientos descritos con más detalle en los siguientes ejemplos.

30 **[0036]** El término “marcado” cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende Apo2L/TRAIL, o una parte de la misma, fusionado con un “polipéptido marcador”. Los polipéptidos marcadores tienen suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el que se puede hacer un anticuerpo o proporcionar alguna otra función, tal como quelación con ion metálico, 35 aunque es suficientemente corto de modo que generalmente no interfiere con la

actividad del TNF de la familia de citocinas. El polipéptido marcador preferiblemente también es bastante único de modo que un anticuerpo específico de marcador no tiene sustancialmente reacción cruzada con otros epítomos. Los polipéptidos marcadores adecuados en general tienen al menos 6 restos de aminoácidos y normalmente entre 5 aproximadamente 8 y aproximadamente 50 restos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 restos).

**[0037]** La expresión “ion metálico divalente” se refiere a un ion metálico que tiene 2 cargas positivas. Los ejemplos de iones metálicos divalentes incluyen, pero sin limitar, cinc, cobalto, níquel, cadmio, magnesio y manganeso. Las formas particulares de dichos metales que se pueden usar incluyen formas de sales (p. ej., formas de sales farmacéuticamente aceptables), tales como formas de cloruro, acetato, carbonato, citrato y sulfato de los iones metálicos divalentes mencionados antes. Opcionalmente, un ion metálico divalente para usar en la presente invención es cinc, y preferiblemente, la forma de sal, sulfato de cinc o cloruro de cinc.

**[0038]** “Aislado”, cuando se usa para describir las diferentes proteínas descritas en el presente documento, significa una proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirán con los usos de diagnóstico o terapéutico de la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, la proteína se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna usando un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul Coomassie, o preferiblemente con plata, o (3) hasta homogeneidad por técnicas espectroscópicas de masas o cartografía de péptidos. La proteína aislada incluye proteína in situ en células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural de Apo2L/TRAIL no estará presente. Sin embargo, normalmente la proteína aislada se preparará por al menos una etapa de purificación.

**[0039]** Una molécula de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante que normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico de Apo2L/TRAIL. Una molécula de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL aislada es distinta en forma o en el marco de como se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL aisladas son distintas de la molécula de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL 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 expresan normalmente la Apo2L/TRAIL cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una posición del cromosoma diferente de la de las células naturales.

5 **[0040]** El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias identificadas en el presente documento, se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de Apo2L/TRAIL, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de  
10 secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias formas que dependen del experto en la materia que puede determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo algoritmos de asignación necesarios para lograr el  
15 alineamiento máximo frente a las secuencias de longitud completa que se están comparando. Para los propósitos del presente documento, se pueden obtener valores de porcentaje de identidad de aminoácidos usando el programa de ordenador de comparación de secuencias, ALIGN-2, producido por Genentech Inc. y la fuente de código que se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de  
20 Copyright de EE.UU., Washington, DC, 20559, registrado con el número de registro de Copyright de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, CA. Todos los parámetros de comparación de secuencias los fija el programa ALIGN-2 y no varían.

**[0041]** La “restricción” de las reacciones de hibridación pueden ser determinadas  
25 fácilmente por el experto en la materia, y en general es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración salina. En general, las sondas más largas requieren mayores temperaturas para la reasociación adecuada, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas menores. En general, la hibridación depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para  
30 reasociarse cuando están presentes cadenas complementarias en un entorno inferior a su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de identidad deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, se sigue que temperaturas relativas más altas tendrán tendencia a hacer las condiciones de reacción más restrictivas, mientras que temperaturas más  
35 bajas las hacen menos restrictivas. Para detalles adicionales y explicación de la

restricción de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

**[0042]** Las “condiciones de restricción altas”, como se define en el presente documento, se identifican como aquellas en que: (1) se usa fuerza iónica baja y temperatura de lavado alta; cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecilsulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) se usa durante la hibridación un agente desnaturalizante; formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) se usa formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón tratado con ultrasonidos (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de restricción alta que consiste en 1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

**[0043]** Las condiciones “moderadamente restrictivas” se pueden identificar como describen Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen incubación durante la noche a 37°C en una disolución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 20 mg/ml, seguido de lavado de los filtros en 1 X SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

**[0044]** La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

**[0045]** El ácido nucleico está “operativamente unido” cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está operativamente unido al ADN para un polipéptido si es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia

codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está situado de forma que facilita su traducción. En general, “operativamente unido” significa que las secuencias de ADN que se van a unir son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, 5 contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se lleva a cabo por ligado en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o conectores oligonucleótidos sintéticos se usan según la práctica convencional.

**[0046]** La expresión “estable al almacenamiento” se usa para describir una 10 formulación que tiene una vida en almacenamiento aceptable para un producto en la cadena de distribución del comercio, por ejemplo, al menos 12 meses a una temperatura dada, y preferiblemente, al menos 24 meses a una temperatura dada. Opcionalmente, dicha formulación estable al almacenamiento no contiene más de 5% de agregados, no más de 10% de dímeros, y/o cambios mínimos en la heterogeneidad 15 de la carga o actividad biológica.

**[0047]** Como se usa en el presente documento, “soluble” se refiere a polipéptidos que, cuando están en disoluciones acuosas, están completamente disueltos, dando como resultado una disolución de transparente a ligeramente opalescente sin partículas visibles, evaluado por inspección visual. Se puede hacer un ensayo adicional de la 20 turbidez de la disolución (o solubilidad de la proteína) midiendo las absorbancias UV de 340 nm a 360 nm con una celda con paso de luz de 1 cm, en la que la turbidez con 20 mg/ml es menor que 0,05 unidades de absorbancia.

**[0048]** Un “osmolito” se refiere a un modificador de la tonicidad o ajustador osmótico que da la osmolalidad a una disolución. Osmolalidad se refiere a la actividad 25 osmótica total a la que contribuyen iones y moléculas no ionizadas en la disolución. Los ejemplos incluyen sales inorgánicas tales como cloruro sódico, polietilenglicoles (PEG), polipropilenglicol, azúcares tales como sacarosa o trealosa, glicerol, aminoácidos y alcoholes de azúcares tales como manitol, que se sabe en la técnica que son generalmente reconocidos como seguros (GRAS).

30 **[0049]** Los “conservantes” pueden actuar para prevenir que bacterias, virus y hongos proliferen en la formulación, y los antioxidantes y otros compuestos pueden funcionar de diferentes formas para preservar la estabilidad de la formulación. Los ejemplos incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los 35 que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros

tipos de compuestos incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol y alcohol bencílico, alquilparabenes tales como metilparabeno o propilparabeno y m-cresol. Opcionalmente, dicho compuesto es fenol o alcohol bencílico. El conservante u otro compuesto se incluirá opcionalmente en una 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 normalmente estará presente en agua para inyección (API) o agua bacteriostática para inyección (ABPI) usada para la reconstitución.

**[0050]** Un “tensioactivo” puede actuar para disminuir la turbidez o desnaturalización de una proteína en la formulación. Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos no iónicos tales como un polisorbato, p. ej., polisorbatos 20, 60 u 80, un poloxámero, p. ej., poloxámero 184 o 188, polioles plurónicos, polímeros de bloques de etileno/propileno o cualquier otro conocido en la técnica que sean GRAS. Opcionalmente, el tensioactivo es un polisorbato o poloxámero.

**[0051]** Un “tampón” como se usa en el presente documento, es cualquier tampón adecuado que sea GRAS y que confiera en general 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. Los ejemplos incluyen Tris, Hepes, trietanolamina, histidina o cualquier otro conocido en la técnica que tenga el efecto deseado.

**[0052]** El término “citocina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúa en otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Están incluidas entre las citocinas las hormonas de crecimiento tales como la hormona del crecimiento humana, N-metionil-hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteínicas tales como la hormona foliculo estimulante (FSH); hormona estimuladora de tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor  $\alpha$  y  $\beta$  de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de

crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  y gamma; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-2, 5 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Como se usa en este documento, el término citocina incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

10 **[0053]** La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (p. ej.,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  y  $Re^{186}$ ), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos 15 de las mismas.

**[0054]** Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN<sup>TM</sup>); sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodepa, 20 carbocuaona, meturedpa, y uredepa; etileniminas y metilamelamines incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetillomelamina; acetogeninas (en especial bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); 25 criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro del óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, 30 prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos tipo enodiino (p. ej. caliqueamicina, en especial caliqueamicina gammaII y caliqueamicina phiII, véase, p. ej., Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como 35 clodronato; una esperamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos

antibióticos de tipo cromoproteínas enodiino), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (Adriamycin™) (incluyendo morfolino-  
5 doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-  
10 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-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como  
15 calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitioetano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; restablecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una eptilona;  
20 etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinán; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (en especial, toxina  
25 T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucilo; gemcitabina (Gemzar™); 6-tioguanina;  
30 mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (Navelbine™); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y  
35 sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores, farmacéuticamente

aceptables. También están incluidos en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo Nolvadex™), raloxifeno, droloxifeno, 4-5 hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston™); inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, la cual regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (Megace™), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (Rivisor™), letrozol (Femara™), y anastrozol 10 (Arimidex™); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores, farmacéuticamente aceptables.

**[0055]** Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una 15 célula, en especial una célula de cáncer que sobreexpresa cualquiera de los genes identificados en el presente documento, sea in vitro o in vivo. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan en exceso dichos genes en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el desarrollo del ciclo celular (en un 20 sitio distinto de la fase S), tal como agentes que inducen la detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxol, e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también pasan a detener en la fase S, por ejemplo agentes alquilantes de ADN tales 25 como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" de Murakami y col. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), en especial la pág. 13.

30 **[0056]** "Biológicamente activo" o "actividad biológica" para los propósitos del presente documento, significa (a) que tiene la capacidad de inducir o estimular la apoptosis en al menos un tipo de célula de cáncer de mamífero o célula infectada por virus in vivo o ex vivo, solo como un agente único o en combinación con un agente quimioterapéutico, (b) es capaz de producir un anticuerpo, es decir, inmunógeno; (c) es 35 capaz de unir y/o estimular un receptor para Apo2L/TRAIL (dichos receptores pueden

incluir el receptor DR4, receptor DR5, OPG, receptor DcR1 y receptor DcR2); o (d) retiene la actividad de un polipéptido Apo2L/TRAIL nativo o natural. Los ensayos para determinar la actividad biológica de Apo2L/TRAIL se pueden llevar a cabo usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como fragmentación de ADN (véase, p. ej., Marsters y col., *Curr. Biology*, 6: 1669 (1996)), inactivación de caspasa, unión a DR4, unión a DR5 (véase, p. ej., documento WO 98/51793, publicado el 19 de Nov., 1998), unión a DcR1 (véase, p. ej., documento WO 98/58062, publicado el 23 de diciembre, 1998), unión a DcR2 (véase, p. ej., documento WO 99/10484, publicado el 4 de marzo, 1999) así como los ensayos descritos en las publicaciones PCT n° 10 WO97/01633, WO97/25428, WO 01/00832 y WO 01/22987.

**[0057]** Las expresiones “apoptosis” y “actividad apoptótica” se usan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada o controlada de muerte celular en mamíferos que va acompañada típicamente de uno o más cambios celulares característicos, incluyendo condensación del citoplasma, pérdida de microvellosidades de la 15 membrana plasmática, segmentación del núcleo, degradación del ADN cromosómico o pérdida de la función mitocondrial. Esta actividad se puede determinar y medir, por ejemplo, por ensayos de viabilidad celular (tales como ensayos de azul de Alamar o ensayos de MTT), análisis FACS, activación de caspasa, fragmentación de ADN (véase, por ejemplo, Nicoletti y col., *J. Immunol. Methods*, 139:271-279 (1991), y 20 ensayos de escisión por poli-(ADP ribosa)polimerasa, "PARP", conocidos en la técnica.

**[0058]** Como se usa en el presente documento, el término “trastorno” se refiere en general a cualquier afección que se beneficie del tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento, incluyendo cualquier enfermedad o trastorno que 25 se pueda tratar con cantidades eficaces de polipéptidos tales como Apo2L/TRAIL. Esto incluyen trastornos crónicos y agudos, así como afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se pueden tratar en el presente documento incluyen cánceres benignos y malignos; trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, trastornos 30 autoinmunes, artritis (incluyendo artritis reumatoide), esclerosis múltiple y VIH/SIDA.

**[0059]** Los términos “cáncer”, “canceroso” o “maligno” se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitar, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Ejemplos más particulares de dichos cánceres 35 incluyen carcinoma de células escamosas, mieloma, cáncer de pulmón de células

pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer  
5 de cuello de útero, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello. Opcionalmente, las células de cáncer expresan el o los receptores DR4 y/o DR5.

[0060] Los términos “tratar”, “tratamiento” y “terapia” como se usan en el presente documento se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia  
10 preventiva. El tratamiento o administración consecutiva se refiere al tratamiento en una base al menos diaria sin interrupción del 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 de naturaleza cíclica.

[0061] El término “mamífero” como se usa en el presente documento se refiere a  
15 cualquier mamífero clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, vacas, caballos, perros y gatos. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un ser humano.

#### **B. Procedimientos de ejemplo y materiales para llevar a cabo la invención**

[0062] La presente invención proporciona diferentes formulaciones y  
20 procedimientos para hacer dichas formulaciones de Apo2L/TRAIL. Diferentes excipientes de formulación pueden potenciar la solubilidad de Apo2L/TRAIL en las formulaciones, por ejemplo, las que son aceptables para usos farmacéuticos y/o potenciar la estabilidad de la proteína Apo2L/TRAIL en una forma (p. ej., forma de trímero) que tenga actividad biológica. Por ejemplo, los autores de la invención han  
25 encontrado que la presencia de diferentes excipientes (por ejemplo, sales de arginina) en dichas formulaciones puede aumentar notablemente la solubilidad y estabilidad de Apo2L/TRAIL.

[0063] El descubrimiento inesperado de la fácil cristalización reversible de Apo2L/TRAIL proporciona además una base para los procedimientos de purificación y  
30 formulaciones estables de Apo2L/TRAIL. En particular, la formación de cristales y posterior secado del material por diferentes procedimientos (incluyendo la liofilización) puede proporcionar la estabilidad a largo plazo de preparaciones a granel de la proteína. Además, se espera que las composiciones cristalinas liofilizadas retengan la estabilidad a lo largo de un intervalo de temperaturas. Los cristales secos  
35 también se pueden usar en formulaciones en suspensión adecuadas para la

administración, p. ej., subcutánea o intramuscular. Como se describe en los ejemplos, las sales de sodio, en particular el sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), proporcionaba cristalización fácil y reversible, con retención de la actividad biológica después de redisolución de la proteína. Los cristales de proteína se pueden después volver a disolver fácilmente en agua o en tampón acuoso, p. ej., una sal de ácido carboxílico de un aminoácido, o se pueden suspender en medio no acuoso sin pérdida de las propiedades fisicoquímicas que pueden ser importantes para la actividad biológica de la proteína.

**[0064]** En general, las formulaciones se preparan usando polipéptidos (proteínas) Apo2L/TRAIL, con el grado de pureza deseado, y diferentes excipientes o componentes, descritos a continuación.

#### **Producción de Apo2L/TRAIL**

**[0065]** La siguiente descripción se refiere a procedimientos de producción de Apo2L/TRAIL mediante cultivo de células hospedadoras transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico que codifica Apo2L/TRAIL y recuperación del polipéptido del cultivo celular.

**[0066]** El ADN que codifica Apo2L/TRAIL se puede obtener de cualquier biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que tiene el ARNm de Apo2L/TRAIL y lo expresa en un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de Apo2L/TRAIL humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejidos humanos, tal como la biblioteca de bacteriófagos de ADNc de placenta humana, descrita en la publicación PCT WO97/25428. El gen que codifica Apo2L/TRAIL también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o por síntesis de oligonucleótidos.

**[0067]** Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos contra Apo2L/TRAIL u oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar los genes de interés o la proteína codificada por los mismos. El cribado de la biblioteca genómica o de ADNc con la sonda seleccionada se puede llevar a cabo usando procedimientos estándar (Sambrook y col., *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 usar la metodología de la PCR (Sambrook y col., véase antes; Dieffenbach y col., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

**[0068]** Los fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de Apo2L/TRAIL se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos adecuados en

el ADN de Apo2L/TRAIL, o por síntesis del polipéptido Apo2L/TRAIL deseado. Dichos fragmentos o variantes representan inserciones, sustituciones y/o deleciones de restos en uno o ambos extremos de la región intracelular, la región transmembranal o la región extracelular de la secuencia de aminoácidos mostrada para la Apo2L/TRAIL de longitud completa en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). Se puede hacer cualquier combinación de inserción, sustitución y/o deleción para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final tenga, por ejemplo, una actividad biológica o actividad apoptótica deseada como se define en el presente documento. En una realización preferida, los fragmentos o variantes tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 90%, e incluso más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con, por ejemplo, las secuencias identificadas en el presente documento para los dominios intracelular, transmembranal o extracelular de Apo2L/TRAIL, o la secuencia de longitud completa para Apo2L/TRAIL. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procedimientos postraduccionales de Apo2L/TRAIL, tal como cambiando el número o posición de los sitios de glicosilación o alterando las características de anclaje en la membrana.

**[0069]** Las variaciones en la secuencia de Apo2L/TRAIL como se ha descrito antes, se pueden hacer usando cualquiera de las técnicas y directrices para las mutaciones conservativas y no conservativas expuestas en la patente de EE.UU. n° 5.364.934. Estas incluyen mutagénesis mediada por oligonucleótido (dirigida), barrido con alanina y mutagénesis por PCR.

**[0070]** Los análisis de barrido con aminoácidos se pueden usar 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 típicamente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo porque 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 y col., *Science* 1989, 244:1081). También se prefiere típicamente la alanina porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra con frecuencia en posiciones enterradas y expuestas (Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., NY); Chothia, *J. Mol. Biol.* 1976, 150:1).

**[0071]** 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 citadas proporcionadas en la Tabla I de la solicitud PCR

publicada WO 01/00832. Dichas variantes de Apo2L/TRAIL típicamente comprenderán una secuencia de aminoácidos que no es natural que difiere de una secuencia de aminoácidos de Apo2L/TRAIL natural (tal como se proporciona en la Figura 1; SEQ ID N°: 1, para una forma de longitud entera o forma madura de Apo2L/TRAIL o una secuencia del dominio extracelular de la misma) en al menos uno o más aminoácidos. Opcionalmente, el uno o más aminoácidos que difieren en la variante de Apo2L/TRAIL comparado con una Apo2L/TRAIL natural, comprenderán sustitución o sustituciones de aminoácidos tales como las indicadas en la Tabla I del documento WO 01/00832. Las variantes de Apo2L/TRAIL de la invención incluyen variantes de Apo2L/TRAIL solubles que comprenden los restos 91-281, 92-281, 95-281 ó 114-281 de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) y que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Las variantes de Apo2L/TRAIL preferidas incluirán aquellas variantes que comprenden los restos 91-281, 92-281, 95-281 ó 114-281 de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) y que tienen una o más sustituciones de aminoácidos que potencian la actividad biológica, tal como la unión al receptor. Una variante particularmente preferida comprende los restos 114-281 de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). En una realización específica, Apo-2L/TRAIL consiste en los restos 114-281 de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1).

**[0072]** Como se describe en el documento WO 01/00832 publicado el 4 de enero, 2001, se llevó a cabo el análisis de la estructura cristalina por rayos X del dominio extracelular de la Apo2L/TRAIL identificada y la mutagénesis por barrido de alanina para proporcionar el mapa de sus regiones de contacto con el receptor. La estructura obtenida para Apo2L/TRAIL puso de manifiesto una proteína homotrímica que contiene un sitio de unión de ion metálico divalente nuevo (cinc) que coordina la interacción de las 3 subunidades de la molécula de trímero de Apo2L/TRAIL. Como otros miembros de la familia de TNF, parece que Apo2L/TRAIL comprende un trímero compacto formado por tres monómeros en barril beta que esconden aproximadamente  $5100 \text{ Angstrom}^2$  ( $1700 \text{ Angstrom}^2$  por monómero) para formar el trímero globular. La posición de las cadenas beta centrales estaba bien conservada comparado con otros miembros caracterizados estructuralmente de la familia de TNF, TNF-alfa, TNF-beta y CD40L, comparado con las cadenas centrales de TNF-alfa o TNF-beta.

**[0073]** Las variaciones en la secuencia de Apo2L/TRAIL también incluidas en el alcance de la invención se refieren a derivados amino terminales o formas modificadas. Dichas secuencias de Apo2L/TRAIL pueden incluir cualquier de los polipéptidos

Apo2L/TRAIL descritos en el presente documento que tenga metionina o metionina modificada (tal como formilmetionilo u otras especies de metionilo bloqueadas) en el extremo N de la secuencia de polipéptido.

**[0074]** El ácido nucleico (p. ej., ADNc o ADN genómico) que codifica la Apo2L/TRAIL natural o variante se puede insertar en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Los diferentes vectores están públicamente disponibles. Los componentes del vector en general incluyen, pero sin limitar, 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 de los cuales se describe a continuación. Las secuencias señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores y secuencias terminadoras de la transcripción opcionales que se pueden usar, son conocidos en la técnica y se describen con más detalle en la publicación PCT WO97/25428.

**[0075]** Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está operativamente unido a la secuencia de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL. Los promotores son secuencias no traducidas situadas arriba (5') desde el codón de inicio de un gen estructural (en general en aproximadamente 100 a 1000 pb) que controla la transcripción y traducción de una secuencia de ácido nucleico particular, tal como la secuencia de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL, a la que están operativamente unidos. Dichos promotores típicamente entran en dos clases, inducible y constitutiva. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles elevados de transcripción a partir del ADN bajo su control, como respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, p. ej., la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. En este momento se conoce un gran número de promotores reconocidos por una variedad de potenciales células hospedadoras. Estos promotores se unen operativamente al ADN que codifica Apo2L/TRAIL eliminando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector. Se puede usar tanto la secuencia promotora de Apo2L/TRAIL natural como muchas secuencias promotoras heterólogas, para dirigir la amplificación y/o expresión del ADN de Apo2L/TRAIL.

**[0076]** Los promotores adecuados para usar con hospedadores procariontes y eucariotes son conocidos en la técnica, y se describen con más detalle en la publicación PCT WO97/25428.

**[0077]** Los procedimientos preferidos para la producción de Apo2L/TRAIL soluble en *E. coli* usan un promotor inducible para la regulación de la expresión del producto. El uso de un promotor controlable inducible, permite que el cultivo crezca hasta la densidad celular deseada antes de inducción de la expresión del producto y la  
5 acumulación de cantidades significativas de producto que pueden no ser bien toleradas por el huésped.

**[0078]** Los autores de la invención han evaluado 3 sistemas promotores inducibles (polimerasa T7, trp y fosfatasa alcalina (AP)) para la expresión de Apo2L/TRAIL (aminoácidos 114-281). El uso de cada uno de estos tres promotores dio como  
10 resultado cantidades significativas del trímero de Apo2L/TRAIL soluble y biológicamente activo que se recuperó de la pasta celular cosechada. Se prefiere el promotor de AP entre estos 3 sistemas promotores inducibles, debido al control más estrecho del promotor y la mayor densidad celular y títulos alcanzados en la pasta celular recogida.

15 **[0079]** La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes listados antes, usa técnica de ligado estándar. Los plásmidos aislados o fragmentos de ADN se escinden, se ajustan a la medida y se vuelven a ligar en la forma deseada para generar el plásmido requerido.

**[0080]** En el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos  
20 contruidos, se pueden usar mezclas de ligado para transformar la cepa de *E. coli* K12 294 (ATCC 31.446) y seleccionar los transformantes satisfactorios mediante resistencia a ampicilina o tetraciclina, cuando sea adecuado. Los plásmidos se preparan a partir de los transformantes, se analizan mediante digestión con endonucleasas de restricción, y/o se secuencian usando técnicas estándar conocidas en la materia (Véase,  
25 p. ej., Messing y col., *Nucleic Acids Res.* 1981, 9: 309; Maxam y col., *Methods in Enzymology* 1980, 65: 499).

**[0081]** Se pueden usar vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria en células de mamífero del ADN que codifica Apo2L/TRAIL. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que se puede replicar  
30 de forma eficaz en una célula hospedadora, de modo que la célula hospedadora acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza niveles altos de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión (Sambrook y col., véase antes). Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula hospedadora, permiten la identificación positiva conveniente de  
35 los polipéptidos codificados por ADN clonados, así como el cribado rápido de dichos

polipéptidos por las propiedades biológicas o fisiológicas deseadas. Por lo tanto, los sistemas de expresión transitoria son particularmente útiles en la invención para el propósito de identificar análogos y variantes de Apo2L/TRAIL que son Apo2L/TRAIL biológicamente activa.

5 **[0082]** Se describen otros procedimientos, vectores y células hospedadoras para la adaptación a la síntesis de Apo2L/TRAIL en cultivo de células de vertebrados recombinantes en Gething y col., *Nature* 1981, 293:620-625; Mantei y col., *Nature* 1979, 281:40-46; documentos EP 117.060; y EP 117,058.

**[0083]** Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión del  
10 ADN en los vectores del presente documento incluyen células procariotas, de levaduras o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen, pero sin limitar, eubacterias, organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p.  
15 ej., *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p. ej., *B. licheniformis* 41P descrito en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Preferiblemente, la célula hospedadora debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas.

20 **[0084]** *E. coli* es la célula hospedadora preferida para usar 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 20 kd de tamaño sin requisito de glicosilación. Como huésped de producción, *E. coli* se puede cultivar hasta una densidad celular relativamente alta y es capaz de producir niveles  
25 relativamente altos de proteínas heterólogas.

**[0085]** Además de los procariotas, los microorganismos eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras, son adecuados para huéspedes de clonación o expresión para vectores que codifican Apo2L/TRAIL. Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de Apo2L/TRAIL glicosilado derivan de organismos  
30 multicelulares. Los ejemplos de todas dichas células hospedadoras, incluyendo células CHO, se describen con más detalle en la publicación PCT n° WO97/25428.

**[0086]** Las células hospedadoras se transfectan y preferiblemente transforman con los vectores de expresión o clonación descritos antes para la producción de Apo2L/TRAIL, y se cultivan en medio nutriente modificado según sea adecuado para  
35 inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes que codifican las

secuencias deseadas.

**[0087]** La transfección se refiere a la absorción de un vector de expresión por una célula hospedadora sean o no expresadas cualesquiera secuencias codificantes. Numerosos procedimientos de transfección son conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, CaPO<sub>4</sub> y electroporación. La transfección satisfactoria en general se reconoce cuando se produce cualquier indicación de la operación de este vector en la célula hospedadora.

**[0088]** Transformación significa introducir ADN en un organismo de modo que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o por integración cromosómica. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se hace usando técnicas estándar adecuadas para dichas células. Generalmente se usa el tratamiento con calcio usando cloruro cálcico, como describen Sambrook y col., véase antes, o la electroporación para células procariotas u otras células que contienen sustanciales barreras de paredes celulares. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de determinadas células de plantas, como se ha descrito (Shaw y col., *Gene* 1983, 23:315 y publicación PCT n° WO 89/05859). Además, las plantas se pueden transfectar usando tratamiento con ultrasonidos, publicación PCT n° WO 91/00358 publicado el 10 de enero, 1991.

**[0089]** Para células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede usar el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio (Graham y van der Eb, *Virology* 1978, 52:456-457). Se han descrito aspectos generales de las transformaciones con sistemas huésped de células de mamíferos en la patente de EE.UU. n° 4.399.216. Las transformaciones en levaduras típicamente se llevan a cabo según el procedimiento de Van Solingen y col., *J. Bact.* 1977, 130:946 y Hsiao y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76:3829. Sin embargo, también se pueden usar otros procedimientos para introducir ADN en las células, tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policondriomas, p. ej., polibreno, poliornitina. Para diferentes técnicas para transformar células de mamíferos, véase Keown y col. *Methods in Enzymology* 1990, 185:527-537 y Mansour y col. *Nature* 1988, 336:348-352.

**[0090]** Las células procariotas usadas para producir Apo2L/TRAIL se pueden cultivar en medio de cultivo adecuado como se describe en general en Sambrook y col., véase antes. Las formas particulares de medio de cultivo que se pueden usar para cultivar *E. coli* se describen con más detalle en la solicitud PCT WO 01/00832. Las células hospedadoras de mamífero usadas para producir Apo2L/TRAIL se pueden

cultivar en una variedad de medios de cultivo.

**[0091]** Los ejemplos de medios de cultivo disponibles en el comercio incluyen el medio F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio Eagle modificado por Dulbecco ("DMEM", Sigma). Cualquiera de  
5 estos medios se puede complementar cuando sea necesario, con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamicina<sup>TM</sup>). oligoelementos (definidos como compuestos  
10 inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo de micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en concentraciones adecuadas que serán conocidos por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares son las usadas previamente con la célula hospedadora  
15 seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

**[0092]** En general, se pueden encontrar principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos de células de mamíferos en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

**[0093]** La expresión de Apo2L/TRAIL se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77: 5201-5205), transferencia en mancha (análisis de ADN), o hibridación in situ, usando una sonda marcada de forma adecuada, basado en las secuencias  
20 proporcionadas en el presente documento. Se pueden usar diferentes marcadores, lo más común son radioisótopos, y en particular <sup>32</sup>P. Sin embargo, también se pueden usar otras técnicas, tales como el uso de nucleótidos modificados con biotina para introducir en un polinucleótido. La biotina sirve entonces como el sitio de unión a la avidina o anticuerpos, que pueden estar marcados con una amplia variedad de  
25 marcadores, tales como radionucleótidos, agentes de fluorescencia o enzimas. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN. dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando el dúplex está unido a una superficie, de modo  
30 que tras la formación del dúplex en la superficie, se puede detectar la presencia del

anticuerpo unido al dúplex.

**[0094]** Alternativamente, la expresión génica se puede medir por procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejidos y ensayo del cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente  
5 la expresión del producto génico. Con técnicas de tinción inmunohistoquímica se prepara una muestra de células, típicamente por deshidratación y fijación, seguido de reacción con anticuerpos marcados específicos para el producto génico acoplado, en el que los marcadores normalmente se detectan de forma visual, tales como marcadores enzimáticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes y similares.

10 **[0095]** Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de la muestra pueden ser monoclonales o policlonales y se pueden preparar en cualquier mamífero. De forma 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 el presente documento o contra secuencia  
15 exógena fusionada al ADN de Apo2L/TRAIL y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

**[0096]** Preferiblemente, la Apo2L/TRAIL se recupera del medio de cultivo como un polipéptido secretado, aunque también se puede recuperar de lisados de células hospedadoras cuando se produce directamente sin una señal secretora. Si la  
20 Apo2L/TRAIL está unida a membrana, se puede liberar de la membrana usando una disolución de detergente adecuada (p. ej., Triton-X 100) o su región extracelular se puede liberar por escisión enzimática.

**[0097]** Cuando Apo2L/TRAIL se produce en una célula recombinante distinta de una de origen humano, la Apo2L/TRAIL carece de proteínas o polipéptidos de origen  
25 humano. Sin embargo, normalmente es necesario recuperar o purificar Apo2L/TRAIL de las proteínas o polipéptidos de las células recombinantes para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para Apo2L/TRAIL. Como primera etapa, el medio de cultivo o lisado se puede centrifugar para separar restos celulares en partículas. Después, Apo2L/TRAIL se purifica de las proteínas y polipéptidos solubles  
30 contaminantes, siendo el siguiente procedimiento ilustrador de los procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico tal como SP-Sepharosa o CM-Sepharosa; hidroxapatito; cromatografía por interacción hidrófoba; precipitación por etanol; cromatocentrado; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel usando, por ejemplo, Sphadex G-75; y diafiltración.

35 **[0098]** La Apo2L/TRAIL se puede aislar por cromatografía de afinidad. Los

fragmentos o variantes de Apo2L/TRAIL en los que se han eliminado, insertado o sustituido restos se recuperan de la misma forma que la Apo2L/TRAIL natural, teniendo en cuenta cualquier cambio sustancial en las propiedades ocasionado por la variación. Por ejemplo, la preparación de una fusión de Apo2L/TRAIL con otra

5 proteína o polipéptido, p. ej., un antígeno bacteriano o vírico, facilita la purificación; se puede usar una columna de inmunoafinidad que contiene anticuerpo contra el antígeno para adsorber el polipéptido de fusión.

**[0099]** También puede ser útil un inhibidor de proteasa tal como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para inhibir la degradación proteolítica durante la

10 purificación, y se pueden incluir anticuerpos para prevenir el crecimiento de contaminantes accidentales. Un experto en la materia apreciará que los procedimientos de purificación para Apo2L/TRAIL natural pueden requerir modificación para tener en cuenta cambios en el carácter de Apo2L/TRAIL o sus variantes tras expresión en cultivo de células recombinantes.

15 **[0100]** Durante cualquiera de dichas etapas de purificación, puede ser conveniente exponer la Apo2L/TRAIL recuperada a una disolución que contiene iones metálicos divalentes o a material de purificación (tal como un medio o soporte cromatográfico) que contiene uno o más iones metálicos divalentes. Los iones metálicos divalentes y/o el agente de reducción se puede usar durante la recuperación o purificación de la

20 Apo2L/TRAIL. Opcionalmente, se pueden usar tanto los iones metálicos divalentes como el agente de reducción, tal como DTT o BME, durante la recuperación o purificación de la Apo2L/TRAIL. Se cree que el uso de iones metálicos divalentes durante la recuperación o purificación ayudará a proporcionar estabilidad al trímero de Apo2L/TRAIL o a preservar el trímero de Apo2L/TRAIL formado durante la etapa de

25 cultivo celular.

#### **PREPARACIÓN DE FORMULACIONES**

**[0101]** En la preparación de formulaciones del presente documento, hay que indicar que la calidad o “grado” recomendado de los componentes usados dependerá del uso final de la formulación. Para usos terapéuticos, se prefiere que el o los

30 componentes estén en una calidad aceptable (tal como “GRAS”) como aditivo para productos farmacéuticos.

**[0102]** En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden Apo2L/TRAIL y uno o más excipientes que proporcionan suficiente fuerza iónica para potenciar la solubilidad y/o estabilidad de la Apo2L/TRAIL, en las que la composición

35 tiene un pH de 6 (o aproximadamente 6) a 9 (o aproximadamente 9). La proteína

Apo2L/TRAIL se puede preparar por cualquier procedimiento adecuado para lograr la pureza deseada de la proteína, por ejemplo, según los procedimientos anteriores. En realizaciones preferidas, la proteína Apo2L/TRAIL comprende los aminoácidos 114-281 de la Figura 1, y más preferiblemente, la proteína Apo2L/TRAIL se expresa de forma recombinante en células hospedadoras de *E. coli*. La concentración de la proteína Apo2L/TRAIL en la formulación puede variar dependiendo, por ejemplo, del uso pretendido de la formulación. Los expertos en la materia pueden determinar sin excesiva experimentación la concentración deseada de la proteína Apo2L/TRAIL. Para usos terapéuticos, la concentración de la proteína Apo2L/TRAIL en la formulación es opcionalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/ml, o aproximadamente 20 mg/ml.

**[0103]** El uno o más excipientes en las formulaciones que proporcionan suficiente fuerza iónica para potenciar la solubilidad y/o estabilidad de Apo2L/TRAIL incluyen una sal de arginina o sulfato sódico, y opcionalmente un ácido inorgánico u orgánico poliiónico, aspartato, succinato sódico, acetato sódico, cloruro sódico, Captisol<sup>TM</sup>, Tris, otro aminoácido, azúcares y polioles tales como trealosa y sacarosa. El tipo de sal usado y la concentración de la sal, preferiblemente es tal que la formulación tiene una fuerza iónica relativamente alta que permite que la Apo2L/TRAIL en la formulación sea estable (es decir, reduce la precipitación y potencia el contenido de trimero) y/o permite que la concentración de proteína soluble supere 2 mg/ml, más preferiblemente que supere 5 mg/ml, incluso más preferiblemente que supere 10 mg/ml, y lo más preferiblemente que alcance una concentración de al menos aproximadamente 20 mg/ml. Opcionalmente, la sal está presente en la formulación en una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 0,5 M. Opcionalmente, la sal de arginina puede comprender citrato de arginina, tartrato de arginina, malato de arginina, succinato de arginina, fosfato de arginina y sulfato de arginina. Más preferiblemente, la sal de arginina está presente en una concentración de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M. Hay que indicar que mientras que el tartrato de arginina es útil como un excipiente en las formulaciones descritas en el presente documento, el uso de ácido tartárico como vehículo en concentraciones mayores (tales como cientos de mM) puede no ser deseable para la administración parenteral o para aplicaciones clínicas humanas. Los autores de la invención han observado en un estudio animal in vivo que concentraciones de vehículo de arginina 0,5 M neutralizadas con tartrato 0,25 M administrados por vía intravenosa a más de 5 ml/kg/h pueden tener un efecto

perjudicial en el tejido renal. Por consiguiente, puede haber un umbral superior de concentración de ácido tartárico por encima del cual el experto en la materia no lo seleccionará para usos clínicos, terapéuticos.

**[0104]** La composición preferiblemente tiene un pH de 6 (o aproximadamente 6) a 9 (o aproximadamente 9), más preferiblemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5 e incluso más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. En un aspecto preferido de esta realización, la composición comprenderá además un tampón para mantener el pH de la composición de al menos aproximadamente 6 a aproximadamente 8. Los ejemplos de tampones que se pueden usar incluyen, pero sin limitar, Tris, HEPES e histidina. Cuando se usa Tris, el pH se puede ajustar opcionalmente de aproximadamente 7 a 8,5. Cuando se usa HEPES o histidina, el pH se puede ajustar opcionalmente de aproximadamente 6,5 a 7. Opcionalmente, el tampón se usa con una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM en la formulación, y preferiblemente en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM.

**[0105]** En particular para formulaciones líquidas (o formulaciones liofilizadas reconstituidas), puede ser conveniente incluir uno o más tensioactivos en la composición. Dichos tensioactivos pueden comprender, por ejemplo, un tensioactivo no iónico como TWEEN<sup>TM</sup> o PLURONICS<sup>TM</sup> (p. ej., polisorbato o poloxámero). Preferiblemente, el tensioactivo comprende polisorbato 20 ("Tween 20"). El tensioactivo se usará opcionalmente en una concentración de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,2%.

**[0106]** Las formulaciones preferidas son aquellas en las que el o los excipientes proporcionan el contenido optimizado de trímero de Apo2L/TRAIL y minimizan la cantidad de formación de dímero de Apo2L/TRAIL (o formación de agregados) o cambios en la distribución de carga. Opcionalmente, la formulación no contiene más de 5% de agregados de Apo2L/TRAIL, no más de 10% de dímero de Apo2L/TRAIL unido por disulfuro (de la cantidad total de proteína Apo2L/TRAIL en la formulación) y/o no más de 10% de cambio en la distribución de carga inicial.

**[0107]** En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona composiciones que comprenden Apo2L/TRAIL de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml y una sal de arginina, en las que la composición tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5 (opcionalmente de 6,8 a 7,5). Opcionalmente, las composiciones comprenden además un tampón tal como Tris y/o un tensioactivo tal como polisorbato 20. Preferiblemente, la proteína Apo2L/TRAIL

no incluye (es decir, no está unida o fusionada a) ninguna molécula(s) marcadoras de epítipo o molécula(s) cremallera de leucina.

**[0108]** En realizaciones incluso más preferidas, la presente invención proporciona composiciones que comprenden Apo2L/TRAIL de aproximadamente 2 a 5 aproximadamente 20 mg/ml, sal de arginina de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5 M, en las que la composición tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5.

**[0109]** Opcionalmente, se puede incluir un ion metálico divalente en las formulaciones. El ion metálico divalente puede ser una molécula de cinc, tal como 10 sulfato de cinc, cloruro de cinc o acetato de cinc. El ion metálico divalente se puede incluir opcionalmente en la formulación en una concentración de aproximadamente 50 micromolar a aproximadamente 400 micromolar.

**[0110]** Las formulaciones de la presente invención pueden incluir, además de Apo2L/TRAIL y los componentes descritos antes, otros componentes o excipientes 15 adicionales diferentes. Opcionalmente, la formulación puede contener, para la administración parenteral, un vehículo farmacéuticamente aceptable o aceptable para la vía parenteral, es decir, uno que no sea tóxico para sus receptores en las dosificaciones y concentraciones usadas y que sea compatible con los otros ingredientes de la formulación. Opcionalmente, el vehículo es un vehículo parenteral, 20 tal como una disolución que es isotónica con la sangre del receptor. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen agua, disolución salina o una disolución tamponada tal como disolución salina tamponada con fosfato (PBS), disolución de Ringer, y disolución de dextrosa. Se describen diferentes vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 25 16ª edición, Osol, A. ed. (1980).

**[0111]** Las formulaciones del presente documento también pueden contener uno o más conservantes. Los ejemplos incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquibencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena 30 larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos, alquilparabenes tales como metilparabeno o propilparabeno y m-cresol. Los antioxidantes incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol butílico; alquilparabenes tales como metilparabeno o 35 propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentenol y m-cresol); polipéptidos

de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo  
5 glucosa, manosa o dextrina; azúcares tales como sacarosa, trealosa o sorbitol; o polietilenglicol (PEG).

**[0112]** Los ejemplos adicionales de dichos vehículos incluyen lecitina, proteína de suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos  
10 saturados vegetales, agua sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, cloruro sódico, polivinilpirrolidona y sustancias basadas en celulosa. Los vehículos para las formas basadas en gel incluyen polisacáridos tales como carboximetilcelulosa sódica o metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y alcoholes de ceras de madera. Las  
15 formas de depósito convencionales incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, yesos, formas de inhalación, pulverizadores nasales, y preparaciones de liberación sostenida.

**[0113]** Las composiciones de la invención pueden comprender formulaciones líquidas (disoluciones líquidas o suspensiones líquidas) y formulaciones liofilizadas,  
20 así como formulaciones en suspensión en las que la proteína Apo2L/TRAIL está en forma de cristales o precipitado amorfo.

**[0114]** La formulación final, si es líquida, preferiblemente se almacena congelada a  $\leq 20^{\circ}\text{C}$ . Alternativamente, la formulación se puede liofilizar y proporcionar en forma de un polvo para reconstituir con agua para inyección que opcionalmente se puede  
25 almacenar a  $2-30^{\circ}\text{C}$ .

**[0115]** La formulación para usar para la administración terapéutica debe ser estéril. La esterilidad se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles (p. ej., membranas de 0,2 micrómetros). Las composiciones terapéuticas en general se ponen en un envase que tiene una entrada de acceso estéril,  
30 por ejemplo, una bolsa o vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

**[0116]** La composición normalmente se almacenará en envases de una unidad o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas o viales sellados, en forma de una disolución acuosa o en forma de una formulación liofilizada para reconstituir. El envase puede ser  
35 cualquier envase disponible en la técnica y se llena usando procedimientos

convencionales. Opcionalmente, la formulación se puede incluir en un dispositivo de inyección de tipo bolígrafo (o cartucho que encaja en un dispositivo tipo bolígrafo), tal como los disponibles en la técnica (véase, p. ej., la patente de EE.UU. 5.370.629), que son adecuados para el suministro terapéutico de la formulación. Como ejemplo de una  
5 formulación liofilizada, se llenan viales de 10 ml con 5,5 ml de disolución acuosa de Apo2L/TRAIL al 2% (p/v) esterilizada por filtración, y la mezcla resultante se liofiliza. Se puede preparar una disolución para inyección reconstituyendo la formulación de Apo2L/TRAIL liofilizada usando, por ejemplo, agua para inyección.

**[0117]** En realizaciones todavía más particulares de las formulaciones, se  
10 proporcionan composiciones que incluyen cristales de Apo2L/TRAIL. Por ejemplo, la composición puede comprender una formulación en suspensión que comprende cristales de Apo2L/TRAIL. Los autores de la invención encontraron sorprendentemente que el estado sólido de la proteína Apo2L/TRAIL a -5°C es cristalino en condiciones iónicas de moderadas a bajas, a diferencia de muchas otras  
15 proteínas conocidas en la materia que son solubles o forman precipitados amorfos en condiciones similares. Además, se encontró que el estado sólido de los cristales de Apo2L/TRAIL solubiliza de forma reversible cuando se lleva a temperatura ambiente sin una pérdida de la actividad biológica de la proteína o efectos adversos en las propiedades bioquímicas de la proteína. Esta observación es bastante diferente de la  
20 desnaturalización o precipitación irreversible observada para otras proteínas conocidas en la materia.

**[0118]** Opcionalmente, los cristales de Apo2L/TRAIL se preparan enfriando una disolución supersaturada de la proteína Apo2L/TRAIL de aproximadamente 20 a aproximadamente 30°C hasta por debajo de aproximadamente 15°C, preferiblemente  
25 aproximadamente de 2 a 8°C, y más preferiblemente, por debajo de aproximadamente 2-8°C. La cristalización se puede llevar a cabo en un modo por lotes o semicontinuo a gran escala, desde unos mililitros a cientos de litros de disolución. La velocidad de cristalización se puede controlar mediante enfriamiento y agitación programados. El equipamiento puede incluir, pero sin limitar, tanques agitados o estáticos con control  
30 de la temperatura superficial y/o interior. También se pueden usar particiones y tubos de aspiración interiores para potenciar la mezcla en los tanques agitados. La nucleación de cristales también se puede controlar mediante siembra [Moore, AIChE Practical Engineering Perspectives, Distillation and Other Industrial Separations, pág. 239-245]. El grado de supersaturación, composición salina, velocidad de enfriamiento, velocidad  
35 de agitación y siembra pueden afectar a la velocidad de formación de los cristales,

distribución del tamaño de cristales y rendimiento de cristales.

[0119] Opcionalmente, para preparar los cristales, la disolución de proteína Apo2L/TRAIL contiene sulfato sódico o cloruro sódico. Opcionalmente, las concentraciones de sales son de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM y opcionalmente el pH es de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 (preferiblemente, pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5).

[0120] La suspensión de cristales de Apo2L/TRAIL se puede lavar para separar las sales. Opcionalmente, la suspensión de cristales se puede lavar con agua. Alternativamente, la suspensión de cristales se puede equilibrar hasta una fuerza iónica baja. Posteriormente, el material se puede secar para el almacenamiento o preparación de formulaciones parenterales. Los procedimientos de secado de cristales pueden incluir, pero no se limitan a secado a vacío estático, secado a vacío con vibración, rotación, o movimiento de agitación facilitado por flujo de aire seco/N<sub>2</sub>, liofilización, secado por atomización y secado en lecho fluidizado.

[0121] Los cristales secados se pueden reconstituir a una formulación líquida y esterilizada para la inyección parenteral. Alternativamente, los cristales secados se pueden suspender en un medio biocompatible de alta viscosidad para la administración subcutánea o intramuscular. El medio de suspensión puede ser acuoso o no acuoso. Los ejemplos de suspensiones acuosas incluyen sistemas basados en celulosa tales como carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa o sistemas basados en polímeros como poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PGLA). Un ejemplo de medio no acuoso es acetato isobutirato de sacarosa (SAIB) predisuelto en disolventes tales como etanol, carbonato de propileno o N-metilpirrolidona. Se puede preparar una suspensión de distribución de tamaño uniforme por homogeneización de cristales secos en el medio viscoso usando, a modo de ejemplo, un homogeneizador de sonda o un microfluidizador.

#### **PROCEDIMIENTOS DE USO Y OTRAS APLICACIONES**

[0122] Apo2L/TRAIL se puede purificar por cristalización. Más en particular, los procedimientos de purificación usan la cristalización de Apo2L/TRAIL y los cristales se pueden secar para el almacenamiento. Los procedimientos proporcionan una alternativa eficaz, eficiente y barata para, por ejemplo, los protocolos de purificación que requieren múltiples purificaciones en columna. El secado del material cristalino también puede proporcionar un modo eficaz de volumen relativamente pequeño de almacenamiento a granel que evita la congelación del material purificado en contenedores de gran capacidad y descongelación del material a granel congelado.

[0123] En los procedimientos, se proporciona una preparación de Apo2L/TRAIL,

tal como una pasta celular que contiene la proteína Apo2L/TRAIL expresada de forma recombinante. Opcionalmente, aunque no se requiere, la pasta celular se puede procesar (por ejemplo, se puede exponer a uno o más agentes de reducción tales como DTT o BME) o purificar parcialmente usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, tal como los procedimientos de cromatografía de intercambio catiónico. Los materiales de cromatografía de intercambio catiónico pueden ser opcionalmente SP-Sepharosa, CM-Sepharosa o resina HS cerámica Macro-Prep. La Apo2L/TRAIL procesada o parcialmente purificada en la preparación se puede cristalizar, por ejemplo, a partir de una disolución supersaturada disminuyendo la temperatura y agitación, usando los procedimientos descritos en el presente documento. Después, los cristales se pueden recoger y lavar con tampón (o agua) (preferiblemente un tampón frío a una temperatura de aproximadamente 2 a 8°C). Los cristales lavados se pueden volver a suspender o disolver a temperatura ambiente.

**[0124]** La Apo2L/TRAIL resolubilizada se puede purificar más por cromatografía de interacción hidrófoba, recrystalizar, lavar y almacenar en forma de material cristalino húmedo a granel. Alternativamente, la etapa de cromatografía de interacción hidrófoba u otra cromatografía se puede omitir en favor de una simple recrystalización. El material cristalino húmedo a granel 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 descrita antes. Opcionalmente, dicha formulación se puede esterilizar por filtración y/o cargar en viales de dosificación individuales y liofilizar para la posterior reconstitución o suspensión. Opcionalmente, la formulación cristalina secada se puede cargar en viales en forma de polvo y convertir en una disolución o suspensión.

**[0125]** Las formulaciones de Apo2L/TRAIL descritas en el presente documento se pueden usar en una variedad de aplicaciones terapéuticas y no terapéuticas. Entre estas aplicaciones están los procedimientos de tratamiento de trastornos, tales como el cáncer, afecciones inmunes relacionadas o afecciones víricas. Dichas aplicaciones terapéuticas y no terapéuticas se describen con más detalle, por ejemplo, en los documentos WO97/25428 WO97/01633 y WO 01/22987.

**[0126]** Las formulaciones de Apo2L/TRAIL se pueden administrar directamente al mamífero por cualquier técnica adecuada, incluyendo la infusión o inyección. La vía de administración específica dependerá, p. ej., del historial médico del paciente, incluyendo cualesquiera efectos secundarios detectados o previstos usando Apo2L/TRAIL y el trastorno particular que se va a corregir. Los ejemplos de

administración parenteral incluyen la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial e intraperitoneal de la composición. Las formulaciones se administran preferiblemente como inyecciones o infusiones repetidas intravenosas (i.v.), subcutáneas (s.c.), intramusculares (i.m.), infusiones intracraneales o como  
5 formulaciones en aerosol adecuadas para el suministro intranasal o intrapulmonar (para el suministro intrapulmonar véase, p. ej., el documento EP 257.956)

**[0127]** Hay que indicar que la presión osmótica de las inyecciones pueden ser importante en la inyección subcutánea e intramuscular. Las disoluciones inyectables, cuando son hipotónicas o hipertónicas, pueden producir dolor a un paciente tras la  
10 infusión. Normalmente, para las formulaciones inyectables terapéuticas del presente documento, se prefiere que la osmolaridad relativa de la disolución inyectable sea de aproximadamente 300 mosm a aproximadamente 600 mosm.

**[0128]** Apo2L/TRAIL también se puede administrar en forma de preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida  
15 incluyen matrices impermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la proteína, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen derivados de celulosa (p. ej., carboximetilcelulosa), acetato isobutirato de sacarosa (SABER<sup>TM</sup>) en medio no acuoso, poliésteres, hidrogeles (p. ej., poli(metacrilato de 2-hidroxietilo)  
20 (Langer y col., *J. Biomed. Mater. Res.* 1981, 15: 167-277; Langer, *Chem. Tech.* 1982, 12: 98-105) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-L-glutamato de etilo (Sidman y col., *Biopolymers* 1983, 22: 547-556), etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer y col., véase antes), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales  
25 como los Lupron Depot (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-(ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico) (documento EP 133.988). Un procedimiento opcional de suministro de fármacos de actuación sistémica implica la administración por infusión continua (usando, p. ej., dispositivos de liberación lenta o minibombas tales como bombas osmóticas o parches  
30 en la piel), o por inyección (usando, p. ej., medios intravenosos o subcutáneos, incluyendo la administración de un solo bolo).

**[0129]** La composición que se va a usar en la terapia se formulará y dosificará de una forma consecuente con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la afección clínica del paciente individual, el sitio de suministro de la composición, el  
35 procedimiento de administración, el plan de administración y otros factores conocidos

por los médicos. Las “cantidades eficaces” de cada componente para los propósitos del presente documento se determinan, por lo tanto, por dichas consideraciones y son cantidades que dan como resultado la biodisponibilidad de la Apo2L/TRAIL u otros fármacos en el mamífero.

5 **[0130]** Como propuesta general, la cantidad farmacéuticamente eficaz total de los polipéptidos Apo2L/TRAIL administrados estará en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día, basado en los kg de peso corporal del paciente, aunque como se ha indicado antes, esto será a discreción del terapéutico.

**[0131]** Aunque se prefiere la inyección, también se puede usar un dispositivo de  
10 infusión para las infusiones continuas. También se puede usar una disolución en bolsa intravenosa.

**[0132]** Se contempla que se pueden usar en los procedimientos además terapias adicionales. La una o más otras terapias pueden incluir, pero sin limitar, la administración de terapia de radiación, citocinas(s), agente(s) inhibidor(es) del  
15 crecimiento, agente(s) quimioterapéutico(s), agente(s) citotóxico(s), inhibidor(es) de tirosina quinasa, inhibidor(es) de ras-farnesil transferasa, inhibidores de angiogénesis e inhibidores de quinasa dependiente de ciclina, que son conocidos en la técnica y se definen además en particular en la Sección I anterior. Además, las terapias basadas en anticuerpos terapéuticos que se dirigen a antígenos tumorales tales como Rituxan<sup>TM</sup> o  
20 Herceptin<sup>TM</sup>, así como anticuerpos antiangiogénicos tales como anti-VEGF, o anticuerpos que se dirigen a receptores de Apo2L, tales como DR5 o DR4.

**[0133]** Se pueden usar planes de preparación y dosificación para los agentes quimioterapéuticos según las instrucciones de los fabricantes o como determine empíricamente el médico experto. Los planes de preparación y dosificación para dicha  
25 quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

**[0134]** Puede ser conveniente administrar también 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 TNFR  
30 (tales como DR4, DR5, OPG, TNFR1, TNFR2). Alternativamente, o además, se pueden coadministrar al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o a dos o más antígenos diferentes descritos en el presente documento. A veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citocinas al paciente. En una realización, las formulaciones de Apo2L se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento.

35 **[0135]** La formulación de Apo2L/TRAIL se puede administrar simultánea o

secuencialmente con dichos otros agentes. Por ejemplo, la formulación de Apo2L/TRAIL se puede administrar como un pretratamiento (antes de la administración de cualquiera de dichos otros agentes), tal como un pretratamiento para células de cáncer que de lo contrario pueden ser resistentes a los efectos apoptóticos de Apo2L/TRAIL.

**[0136]** La invención también proporciona kits que incluyen una formulación descrita en el presente documento. Un kit típico comprenderá un envase, preferiblemente un vial, para Apo2L/TRAIL en uno o más excipientes descritos antes; e instrucciones, tales como un prospecto o etiqueta del producto, indicando al usuario cómo usar la formulación de Apo2L/TRAIL. Este preferiblemente proporcionará una formulación farmacéutica. Preferiblemente, la formulación farmacéutica es para tratar el cáncer o una afección inmune relacionada. Los envase adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los envases pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una formulación de Apo2L/TRAIL que es eficaz para el diagnóstico o tratamiento del trastorno y pueden tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta en o asociada con el envase, indica que la formulación se usa para el diagnóstico o tratamiento del trastorno elegido. El artículo fabricado puede comprender además un segundo envase que comprende agua para inyección, una disolución farmacéuticamente aceptable, disolución salina, disolución de Ringer o disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales convenientes desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas, y prospectos con instrucciones de uso.

### **EJEMPLOS**

**[0137]** Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con propósitos ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna forma. Los reactivos comerciales a los que se hace referencia en los ejemplos se usaron según las instrucciones del fabricante salvo que se indique otra cosa. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria descriptiva, por sus números de acceso ATCC, es la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

**[0138]** Las formulaciones se prepararon y los ensayos se llevaron a cabo para identificar las formulaciones de Apo2L/TRAIL que tenían las características deseables

desde un punto de vista terapéutico, diagnóstico y/o comercial. En particular, los autores de la invención buscan identificar componentes de la formulación y condiciones que, entre otras cosas, puedan potenciar la solubilidad de la Apo2L/TRAIL biológicamente activa, en particular en concentraciones de hasta al  
5 menos 20 mg/ml, y que puedan proporcionar estabilidad tras el almacenamiento a 2-8°C o a temperatura ambiente. Los autores de la invención también buscan identificar formulaciones de Apo2L/TRAIL para usar en clínica, que puedan preservar el contenido de trímero no covalente nativo de la proteína, la distribución de carga y/o la actividad biológica durante el almacenamiento.

10 **EJEMPLO 1: Formulaciones líquidas de Apo2L/TRAIL con solubilidad y estabilidad potenciadas**

**[0139]** La proteína Apo2L/TRAIL que consiste en los aminoácidos 114-281 (véase la Figura 1) se expresó en *E. coli* bajo el control del promotor de AP (preparación y expresión descritas en el Ejemplo 8 (Sección A) del documento WO  
15 01/00832 publicado el 4 de enero, 2001), y se purificó a partir de los lisados celulares de *E. coli*, mediante 3 etapas cromatográficas que consistían en cromatografía de intercambio catiónico, de hidroxapatito y de interacción hidrófoba (documento WO 01/00832, Ejemplo 8, Sección C). En la tercera separación cromatográfica, la proteína Apo2L/TRAIL se eluyó en sulfato Na 600 mM o sulfato amónico 400 mM, Tris 50  
20 mM, pH 7,5. Después, la proteína se intercambió con tampón contra los diferentes excipientes de formulación listados en la Tabla 1 por diálisis, y después se concentró a temperatura ambiente usando la filtración con Centricon-10 hasta concentraciones de 20 mg/ml. Después las muestras se filtraron a través de filtros de 0,22 micrómetros y se almacenaron a 2-8°C o 30°C para evaluar la solubilidad y estabilidad.

25 **[0140]** Como se muestra en la Tabla 1, se examinaron aproximadamente 20 excipientes diferentes. Se usaron excipientes de calidad NF, USP o EP de alta pureza de fuentes comerciales comunes (Sigma, Mallinkrodt) salvo que se indique lo contrario, como sigue: alfa,alfa-trealosa dihidrato (Pfanstiehl o Senn), sacarosa (Pfanstiehl), Captisol™ (Cydex), arginina base libre (Ajinomoto o Kyowa Hakko  
30 Kogyo). Los criterios usados para el cribado inicial de excipientes incluían 1) solubilidad a 2-8°C (las condiciones de almacenamiento de preparaciones a granel antes de cargarlas en viales), 2) solubilidad a escala de fabricación en las etapas de ultrafiltración y diafiltración, 3) estabilidad del líquido a corto plazo y estabilidad en la congelación-descongelación, y 4) estabilidad física de la formulación liofilizada. La  
35 solubilidad a 2-8°C se evaluó por evaluación visual periódica de la precipitación

durante hasta 1 mes y se confirmó por barrido de espectroscopía UV usando un coeficiente de extinción de 1,53 a 278 nm.

[0141] La Tabla 1 indica que los excipientes que tienen condiciones de fuerza iónica relativamente alta proporcionaban solubilidad a concentraciones de 5 Apo2L/TRAIL por encima de 10 mg/ml a 2-8°C.

**TABLA 1**

<b>Excipiente</b>	<b>Solubilidad a 2-8°C</b>
Trealosa al 8%	<3 mg/ml
Sacarosa al 8%	<3 mg/ml
Sacarosa al 16%	<2 mg/ml
Lactitol al 6%	<2 mg/ml
Sacarosa al 4%/Manitol al 4%	<2 mg/ml
PEG3350 al 5%	<5 mg/ml
Glicerol al 20%	<5 mg/ml
NaCl 0,15 M	<5 mg/ml
Fosfato Na 0,25 M	<5 mg/ml
Glicina 0,5 M	<12 mg/ml
Aspartato 0,5 M	10-20 mg/ml
Sulfato Na 0,5 M	10-20 mg/ml
Acetato Na 0,5 M	> 20 mg/ml
Cloruro Na 0,5 M	> 20 mg/ml
Sulfobutiléter-beta-ciclodextrina (Captisol™) al 24%	> 20 mg/ml
Tris 0,5 M	> 20 mg/ml
Tartrato de Arginina 0,5 M	> 20 mg/ml

[0142] Después se evaluó la estabilidad del líquido a corto plazo (periodo de tiempo de almacenamiento de 1 semana a 30°C) para varias de las preparaciones mostradas en la Tabla 1 que proporcionaban solubilidad de Apo2L/TRAIL en 10 concentraciones de aproximadamente 20 mg/ml. La estabilidad a corto plazo se evaluó mediante evaluación visual de la turbidez, por HPLC de exclusión por tamaños (SEC) para determinar la cantidad de trímero nativo y de agregados en las preparaciones, y por HPLC de intercambio iónico (IEX) para determinar la distribución de carga. La SEC se llevó a cabo en una columna Superosa 12 (Pharmacia) y una fase móvil de 15 fosfato Na 13 mM, sulfato amónico 400 mM (pH 6,5) usando una velocidad de 0,6 ml/min. La IEX se llevó a cabo usando una columna ProPac WCX-10 (Dionex) a 40°C

y gradiente de NaCl usando una velocidad de 0,5 ml/min.

**[0143]** Los resultados se muestran en la Figura 2. Las preparaciones de sulfato sódico, tartrato de arginina, Captisol<sup>TM</sup> y acetato sódico presentaban la mayor estabilidad en uno o ambos ensayos (Figura 2).

5 **EJEMPLO 2: Formulaciones de Apo2L/TRAIL liofilizadas que contienen sales de arginina**

**[0144]** Los autores de la invención encontraron que las formulaciones de Apo2L/TRAIL que contenían sales de arginina se podían concentrar fácilmente a > 20 mg/ml de proteína por ultrafiltración y diafiltración. Debido a determinadas  
10 propiedades farmacocinéticas in vivo de la forma de 114-281 aminoácidos de Apo2L/TRAIL de la proteína (descrito en el Ejemplo 1), los autores de la invención buscaron en particular identificar una formulación estable que tuviera proteína Apo2L/TRAIL  $\geq 20$  mg/ml.

**[0145]** Para identificar las sales de arginina que proporcionan productos  
15 liofilizados farmacéutica y comercialmente viables, se evaluó la estabilidad física de las formulaciones con vehículo que contenían diferentes sales de arginina. Las sales de arginina se prepararon por valoración de la base libre de arginina 0,5 M con diferentes ácidos (mostrados en la Tabla 2) para dar una disolución de pH 7 en Tris 20 mM. Se cargaron 2 ml de preparaciones en viales de vidrio de 5 ml y se sometieron a un ciclo  
20 de congelación-secado (liofilización) largo conservativo (congelación a -50°C, secado primario a 0°C y secado secundario a 42°C). También se determinó la osmolalidad de las disoluciones (antes de liofilización) usando procedimientos de depresión de la presión de vapor para identificar las preparaciones que pueden ser adecuadas para la administración IV en un marco clínico.

25 **[0146]** La tabla 2 indica que las preparaciones liofilizadas que contienen ácidos orgánicos o inorgánicos polianiónicos presentaban una estabilidad física más conveniente que las preparadas usando ácidos monoaniónicos. Los productos liofilizados de las sales polianiónicas aparecían como tortas secas intactas sólidas (indicadas en la Tabla 2 como “sí”), más que fundidas, gelificadas, colapsadas,  
30 fenestradas, en forma de huevo o cubiertas fragmentadas (indicado en la Tabla 2 como “no”).

**[0147]** Además, las sales de arginina 0,5 M de ácidos polianiónicos demostraron una osmolalidad que puede ser adecuada para la administración IV (menos de 2 veces hipertónica), a diferencia de las sales de arginina monoaniónicas (p. ej., el lactato de  
35 arginina 0,5 M da una disolución 3,1x hipertónica) y algunas de las otras preparaciones

de fuerza iónica relativamente alta que presentaban buena solubilidad y estabilidad del líquido (p. ej., el acetato sódico 0,5 M da una disolución 3,4 veces hipertónica).

**TABLA 2**

Sales de arginina	¿Estabilidad física del lio. aceptable?	Osmolalidad de la disolución 0,5 M*
Citrato-Arg	Si	505
Tartrato-Arg	Si	530
Malato-Arg	Si	573
Succinato-Arg	Si	630
Oxalato-Arg	Si	ND
Lactato-Arg	No	927
Glicolato-Arg	No	ND
Acetato-Arg	No	978
Glutamato-Arg	No	899
Fosfato-Arg	Si	465
Sulfato-Arg	Si	462
Nitrato-Arg	No	774
Arg-HCl	No	830

\*Los valores son mosmol/kg. Las disoluciones isotónicas tienen una osmolalidad de aproximadamente 292-300. "ND" indica que el valor no se determinó.

**[0148]** Basándose en los resultados obtenidos en el estudio indicado en la Tabla 2, después se evaluó en varias formulaciones liofilizadas que contenían Apo2L/TRAIL, la estabilidad bioquímica de la proteína después de almacenamiento a diferentes temperaturas. La Apo2L/TRAIL (restos 114-281; preparada como se describe en el Ejemplo 1) se formuló por ultrafiltración/diafiltración a 10 mg/ml en tartrato de arginina o citrato de arginina 0,5 M, o a 3 mg/ml en sacarosa o trealosa al 8%. Todas estas preparaciones contenían Tris 20 mM, pH 7,0 y polisorbato 20 al 0,01%. Después, las muestras se liofilizaron como se ha descrito antes. La estabilidad se evaluó midiendo el contenido de trímero nativo y agregados usando SEC (descrito en el Ejemplo 1) y la distribución de carga usando IEX (descrito en el Ejemplo 1).

**[0149]** Después de 4 meses de almacenamiento a 40°C, se determinó el % de trímeros y el % del pico principal de IEX con respecto a una disolución control sin liofilizar que se almacenó a -70°C (véase la Figura 3A). Los datos en la Figura 3A indican que las formulaciones liofilizadas que contenían sal de arginina presentaban

una mayor estabilidad comparadas con las preparaciones de formulaciones que contenían sacarosa o trealosa.

**[0150]** Para examinar más los efectos de la sal de tipo arginina en la estabilidad de las formulaciones de Apo2L/TRAIL, se hizo el seguimiento de la estabilidad bioquímica de la proteína de formulaciones tanto líquidas como liofilizadas de 4 formulaciones diferentes de Apo2L/TRAIL 20 mg/ml que contenían sal de arginina. La estabilidad del líquido se siguió a 2-8°C y a temperatura ambiente durante hasta 1 mes (Tabla 3) y la estabilidad del liofilizado se siguió a 50°C durante 1 mes (Figura 3B).

10 **[0151]** Además de llevar a cabo los ensayos de SEC e IEX descritos en el Ejemplo 1, se siguió la formación de dímero covalente por SEC en condiciones desnaturalizantes (SDS-SEC). El ensayo de SDS-SEC se llevó a cabo usando una columna TSK-2000XL (TosoHaas) y a 0,6 ml/min en una fase móvil que consistía en fosfato sódico 25 mM, SDS al 0,1%, NaCl 200 mM. Las muestras se diluyeron hasta 15 mg/ml de proteína con una disolución de Tris 50 mM (pH 7,0), NaCl 200 mM, SDS al 0,5%, pH 9 y yodoacetamida 5 mM (Sigma). Las muestras después se incubaron a 50°C durante 10 minutos antes de los análisis por HPLC.

**[0152]** La bioactividad de Apo2L/TRAIL en las diferentes formulaciones también se determinó usando células SK-MES-1 y tinción con azul Alamar para los recuentos de células viables. En el ensayo, la formulación de Apo2L/TRAIL (50 µl a 2 µg/ml) se añadió al medio de ensayo (albúmina de suero bovino al 0,1%, RPMI 1640) y se hicieron diluciones de 2 veces en placas de 96 pocillos. Después, se añadieron 50 µl de células SK-MES-1 (línea de células de carcinoma de pulmón humano, ATCC HTB58) a los pocillos a una densidad de 20000 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 25 24 horas a 37°C, y se añadió azul Almar durante las últimas 4 horas de las 24 horas de tiempo de incubación. La intensidad de la tinción se determinó en una lectora de placa de fluorescencia con una longitud de onda de excitación ajustada a 530 nm y emisión a 590 nm. Un ajuste de 4 parámetros en el intervalo de ensayo de 0,1 a 1000 ng/ml dio la DE50, o la concentración de Apo2L/TRAIL que inducía 50% de muerte de células. La 30 potencia de muerte celular aumenta con la disminución de DE50.

**[0153]** Como se muestra en la Tabla 3, después de 1 mes de almacenamiento de las formulaciones líquidas a 2-8°C, las 4 formulaciones que contenían sal de arginina mostraron solo pequeñas diferencias en la calidad de Apo2L/TRAIL. La formulación de sulfato de arginina presentó la mayor extensión de formación de agregados. La 35 formulación de malato de arginina presentó la mayor extensión de formación de

dímero y las formulaciones de fosfato de arginina y malato de arginina mostraron el mayor cambio en el % del área del pico principal de IEX.

**[0154]** Después de 2 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente, las formulaciones con sulfato de arginina y succinato de arginina retenían el mayor nivel de bioactividad (Tabla 3).

**[0155]** En general, la formulación de succinato de arginina demostró características de estabilidad algo superiores para la Apo2L/TRAIL en estado líquido.

Tabla 3

Formulaciones	% de Trímero <sup>1</sup>	% del pico principal de IEX que queda <sup>1</sup> (% del control)	% de Monómero <sup>1</sup>	Bioactividad <sup>2</sup>
Malato de arginina	96,2	105,1	93,4	77,0
Succinato de arginina	96,2	94,7	94,9	88,5
Sulfato de arginina	95,4	93,4	93,3	90,5
Fosfato de arginina	96,0	91,0	91,8	74,3
<sup>1</sup> Los datos son para 1 mes de almacenamiento a 2-8°C,				
<sup>2</sup> Los datos son para 2 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente.				

**[0156]** La estabilidad de las formulaciones liofilizadas que contienen estas sales de arginina, después de 1 mes de almacenamiento a 50°C, se evaluó también por SCE, IEX y SDS-SEC (usando los protocolos descritos antes). No se observaron cambios en las propiedades fisicoquímicas (véase la Figura 3B), lo que sugería que se podría lograr una estabilización significativa de Apo2L/TRAIL por liofilización de formulaciones de Apo2L/TRAIL que contenían sales de arginina. En la figura 3C se muestra un perfil de Arrhenius usando estabilidad con temperatura acelerada de una formulación liofilizada de Apo2L/TRAIL 10 mg/ml en tartrato de arginina 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,0, polisorbato 20 al 0,01%, sulfato de Zn 0,33 mM, y predice una vida en almacenamiento relativamente larga a 2-8°C y una vida en almacenamiento >2 años a temperatura ambiente. Los autores de la invención han encontrado que una formulación liofilizada (“lio”) que contiene Apo2L/TRAIL 20 mg/ml en Tris 20 mM, pH 7,2, succinato de arginina 0,5 M y polisorbato 20 al 0,02% era estable a temperaturas tan altas como 50°C durante al menos 12 meses (Tabla 4). La cinética de cambio en el % del pico principal de IEX predice una vida en almacenamiento significativamente larga (>7 años) a 2-8°C (así como a temperatura ambiente), como con la formulación descrita antes en la Figura 3C.

Tabla 4

Temperatura	% de Trímero	% del pico principal de IEX	% de monómero
-70°C control líquido	97,4	46,1	99,0
Lio, 2-8°C, 12 meses	97,5	46,5	99,0
Lio, 30°C, 12 meses	97,3	45,4	98,8
Lio, 40°C, 12 meses	97,4	44,6	98,8
Lio, 50°C, 12 meses	97,3	42,5	98,7

**EJEMPLO 4: Efectos del pH en formulaciones de Apo2L/TRAIL**

**[0157]** Como se describe en el documento WO 01/00832 publicado el 4 de enero, 2001 (véase también, Hymowitz y col., *Biochemistry*, 39:633-640 (2000), la proteína Apo2L/TRAIL forma un homotrímero con un tiol coordinado a Zn en la posición de la cisteína 230 de cada monómero, y la formación de un enlace disulfuro intramolecular en la cisteína 230 da como resultado la pérdida de bioactividad de la proteína. Las proteínas que contienen cisteína típicamente se formulan a pH bajo, bien por debajo del pKa de los grupos tiol, para prevenir la formación del enlace disulfuro (véase, p. ej., N. Derby y T. Creighton, "Disulfide Bonds in Protein Folding and Stability," *Methods in Enzymology*, Vol 40 (editado por B.A. Shirley; Humana Press Inc, Totowa, NJ), Capítulo 10 (1995)). Sorprendentemente, como ponen de manifiesto los resultados discutidos a continuación, se encontró que la estabilidad del trímero de Apo2L/TRAIL nativo disminuía con la disminución del pH.

**[0158]** La Apo2L/TRAIL que consiste en los aminoácidos 94-281 (Figura 1) (denominada en el presente documento y en la Figura 4 "Apo2L/TRAIL. 2") se preparó esencialmente como se describe en el documento WO 01/00832, excepto que se usó una cromatografía de afinidad por quelación de Ni en lugar de HIC en la tercera etapa cromatográfica. Las formulaciones se prepararon por diálisis en succinato de Na 10 mM (intervalo de pH de 5,5, a 6,5) o fosfato de Na 10 mM (intervalo de pH de 7 a 7,5). La estabilidad del líquido de estas formulaciones se evaluó por SEC y los ensayos de bioactividad se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en los ejemplos a continuación.

**[0159]** En 1 día de almacenamiento a temperatura ambiente, las formulaciones que tienen pH inferior a pH 6,5 pierden el contenido de trímero y la bioactividad (véase la figura 4A). Este perfil de estabilidad de pH se observó con otras variantes de la proteína Apo2L/TRAIL. Por ejemplo, una formulación de Apo2L/TRAIL marcada con

polihistidina que consistía en los aminoácidos 114-281 (Figura 1) (His-Apo2L/TRAIL; preparada esencialmente como describen Ashkenazi y col., "Safety and Antitumor Activity of Recombinant Soluble Apo2 ligand", *JCI*, 104:155-162 (1999) se preparó en succinato Na 10 mM (pH de 5,5 a 6) o tampones de fosfato Na 10 mM (pH de 6,5 a 7).

5 Después de almacenamiento a 30°C durante 1 semana, se encontró que la estabilidad del trímero y la bioactividad (determinados como se ha descrito antes para las formulaciones de la Figura 4A) se habían potenciado a  $\text{pH} \geq 6,5$  (véase la Figura 4B).

**[0160]** El análisis de la estructura cristalina de Apo2L/TRAIL pone de manifiesto que la coordinación de un átomo de Zn intrínseco con 3 tioles libres de las cisteínas  
10 230 es necesaria para el plegado adecuado y la estabilidad estructural natural de la proteína (véase el documento WO 01/00832 y Hymowitz y col., véase antes). El perfil de estabilidad de pH inesperado de Apo2L/TRAIL, aunque no se entiende del todo, se cree que está asociado con la pérdida de la unión del Zn al trímero ya que el resto de tiol está más protonado a pH más bajos (véase la Figura 5). Se cree que el pH neutro en  
15 el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5 será el más preferido para mantener la bioactividad y estabilidad fisicoquímica de las formulaciones de Apo2L/TRAIL.

#### EJEMPLO 5: Efecto del tensioactivo en la estabilidad de Apo2L/TRAIL

**[0161]** Para examinar el efecto del tensioactivo en la estabilidad de las  
20 formulaciones de Apo2L/TRAIL, se prepararon formulaciones que contenían Apo2L/TRAIL 20 mg/ml (proteína 114-281 (Figura 1); preparada como se describe en el Ejemplo 1) en succinato de arginina 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,2, y diferentes concentraciones de Tween 20 (0,005%, 0,01%, 0,02% o nada (como control), y se agitaron a 70 rpm a temperatura ambiente durante hasta 24 horas en viales de vidrio  
25 colocados en horizontal. En 1 hora de agitación, se observó un aumento de la dispersión de la luz (medida por la absorbancia en el intervalo de 340-360 nm) cuando la concentración de Tween 20 cayó por debajo de 0,005% (Figura 6).

**[0162]** Por lo tanto, se cree que puede ser preferible incluir tensioactivo(s) no iónico(s) tales como Tween 20 en las formulaciones de Apo2L/TRAIL para potenciar  
30 la estabilización frente a la agitación y la manipulación que pueden desnaturalizar la proteína a granel en las interfases de aire-agua.

#### EJEMPLO 6: Efecto del sulfato de Zn en la estabilidad de formulaciones líquidas de Apo2L/TRAIL

**[0163]** Se preparó una formulación líquida de Apo2L/TRAIL, que consistía en los  
35 restos 114-281 (Figura 1) (preparada como se describe en el Ejemplo 1) usando

Apo2L/TRAIL 20 mg/ml, tartrato de arginina 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,0, en presencia de sulfato de Zn 0, 117  $\mu$ M o 330  $\mu$ M. Después de almacenamiento a 30°C o a 2-8°C durante hasta 2 meses, se evaluó la estabilidad por SEC, IEX y SDS-SEC (como se ha descrito antes en los Ejemplos 1 y 2) con respecto a las muestras de control a -70°C.

5 **[0164]** Como se muestra en la Figura 7, la adición de sulfato de Zn a las formulaciones proporcionaba una mayor estabilización frente a la formación de dímero intramolecular unido por disulfuro. Aunque el sulfato de Zn no afectaba a la estabilidad de Apo2L/TRAIL a 2-8°C, mejoraba la estabilidad frente a la formación de dímero a temperaturas más altas (Figura 7).

10 **EJEMPLO 7: Cristalización reversible de Apo2L/TRAIL biológicamente activa**

**[0165]** Los autores de la invención han encontrado que en condiciones de baja solubilidad de Apo2L/TRAIL (por ejemplo, con fuerza iónica de moderada a baja), la proteína puede cristalizar. Como se describe en el presente documento, la velocidad de cristalización, el tamaño de partículas y el rendimiento se pueden controlar para dar  
15 procedimientos industriales útiles para la purificación, almacenamiento a granel, y formulación de Apo2L/TRAIL en suspensión de liberación controlada.

**[0166]** La proteína Apo2L/TRAIL que consistía en los restos 114-281 (Figura 1) (preparada como se describe en el Ejemplo 1) se formuló a temperatura ambiente usando una columna NAPS (Pharmacia) con elución en Tris 20 mM, pH 7,2, y  
20 diferentes concentraciones de sulfato de Na. Después de elución a temperatura ambiente, en unas horas se observaron cristales de forma hexagonal de diferentes longitudes (véase la figura 8). La solubilidad en el equilibrio se alcanzó cuando las muestras se rotaron continuamente durante 3-4 días a una temperatura dada. Había un mínimo en la solubilidad a una fuerza iónica de aproximadamente 10-50 mM. La  
25 solubilidad aumentó hasta un máximo para sulfato Na aproximadamente 0,3 M y después disminuyó hasta que se alcanzó la solubilidad limitante de la sal. El patrón era similar a temperaturas más altas, pero la solubilidad aumentó con el aumento de temperatura. La observación del aumento de solubilidad de la proteína (por lo tanto disminución de la cristalización) con el aumento de la concentración de sales en el  
30 intervalo de sal del centenar milimolar es diferente de lo que se entiende normalmente con respecto a otras proteínas, en las que la propensión a cristalizar tiende a aumentar con el aumento de la concentración de sal (véase, p. ej., A. Ducruix y MM Reis-Kautt, "Solubility Diagram Analysis and the Relative Effectiveness of Different Ions on Protein Crystallization," *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 1,  
35 pág. 25-30 (1990)).

**[0167]** Las sales catiónicas monovalentes (tales como cloruro sódico) proporcionaban la mayor propensión a cristalizar como se muestra en la Figura 9, mientras que las sales catiónicas divalentes (p. ej., cloruro de calcio y cloruro de magnesio) redujeron significativamente la cristalización. La cristalización también se produjo en disoluciones de aminoácidos cargados positivamente (sales de lisina y sales de arginina) y cargados negativamente (ácido aspártico) en concentración inferior a 0,3 molar (véase la Figura 9), aunque las sales de arginina redujeron la propensión a cristalizar con la misma fuerza iónica.

**[0168]** Para identificar los diferentes parámetros del proceso de cristalización, 0,5 litros de una disolución que contenía Apo2L/TRAIL 5 mg/ml (restos 114-281; preparada como se describe en el Ejemplo 1), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M y Tris 20 mM a pH 7,2, se sometió a una sola etapa de enfriamiento desde temperatura ambiente a 5°C. Se llevaron a cabo 4 experimentos con velocidades de agitación en el intervalo de 0 a 200 rpm. La concentración de Apo2L/TRAIL en el líquido sobrenadante se midió a intervalos de 10 minutos usando espectroscopía UV para seguir el avance de la cristalización.

**[0169]** La Figura 10A muestra que la cristalización se había completado en más de 90% en 2 horas cuando el conjunto se agitó a 50 rpm o más rápido. La cristalización sin agitación era mucho más lenta, en comparación. La cristalización estática no alcanzó el 90% de completado hasta 2 días después de empezar el enfriamiento. Parece que la velocidad de cristalización aumentaba con el aumento de la velocidad de agitación.

**[0170]** La Figura 10B representa el perfil de disolución de cristales de Apo2L/TRAIL con agitación. La suspensión de cristales se calentó desde 5°C a 30-35°C con la misma velocidad de calentamiento en cada experimento de disolución. La concentración de Apo2L/TRAIL en el líquido sobrenadante se midió en intervalos de 5 min para seguir la velocidad de disolución. La velocidad de disolución de los cristales aumentó cuando la velocidad de agitación aumentó de 50 rpm a 200 rpm. La velocidad de transferencia de calor entre la camisa del tanque y la suspensión de cristales también se potenció cuando aumentó la velocidad de agitación. A una velocidad de agitación de 100 rpm, se logró la disolución completa en media hora cuando la temperatura de la muestra era aproximadamente 35°C.

**[0171]** La Figura 10C muestra la distribución del tamaño de los cristales en función de la velocidad de agitación durante la cristalización. La distribución del tamaño de los cristales se midió usando un analizador del tamaño de partículas

Malvern MasterSizerX. El diámetro medio ( $D[v, 0,5]$ ) disminuyó cuando aumentó la velocidad de agitación y la distribución del tamaño de los cristales ( $D[v, 0,1]$  a  $D[v, 0,9]$ ) se hizo más uniforme con agitación más rápida. Por lo tanto, parece que la manipulación de la velocidad de agitación durante la cristalización es eficaz para controlar el diámetro medio de los cristales de Apo2L/TRAIL así como la distribución del tamaño de los cristales, lo cual puede ser conveniente para las formulaciones de liberación controlada.

**EJEMPLO 8: Secado de los cristales de Apo2L/TRAIL**

**[0172]** Para evaluar la viabilidad de secar cristales de Apo2L/TRAIL para la formulación de liberación controlada o el almacenamiento a granel, se evaluaron 3 procedimientos diferentes de secado.

**[0173]** El primer procedimiento de secado evaluado era el secado a vacío estático. La Apo2L/TRAIL (aminoácidos 114-281; purificada por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1) se cristalizó en Tris 20 mM, sulfato sódico 0,1 M, pH 7,2 y se lavó con agua fría para separar el exceso de sal. La suspensión cristalina después se cargó en viales de vidrio abiertos y se secó a vacío a 737-762 mm de Hg a temperatura ambiente durante la noche. Los cristales secos se disolvieron hasta 2-3 mg/ml en agua o en sal de arginina 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,2.

**[0174]** El segundo procedimiento de secado evaluado fue el secado a vacío con vibración (aparato obtenido de SWECO Co.) para permitir un flujo mejor y disminución de aglomerados de sólido. La suspensión de cristales se cargó en un filtro de 20  $\mu\text{m}$  para separar la mezcla de líquido, y los cristales húmedos se lavaron con tampón de Tris frío (20 mM, pH 7,5) o mezcla de etanol-agua (al 50%, 63%, 75%, 100%, vol/vol). Los cristales lavados se secaron pasando nitrógeno gaseoso deshumidificado desde la parte inferior del filtro. Un ligero vacío (203-254 mm de Hg) desde la parte superior de la cámara de filtro facilitaba la velocidad de secado. Además, la cámara de filtro que contenía los cristales húmedos vibraba a 1.800 rpm para romper la torta húmeda en un polvo fino durante el procedimiento de secado. El procedimiento de secado se siguió usando un sensor de humedad relativa. El producto seco se recuperó a través de un puerto de descarga. Los lavados con mezcla de etanol-agua produjeron un polvo más fino y que fluía mejor que los cristales lavados con tampón de Tris, lo que a su vez aumentó el rendimiento del procedimiento. Estos cristales se disolvieron en una sal de arginina 0,5 M tamponada, como se ha descrito para los cristales secados a vacío.

**[0175]** El tercer procedimiento de secado evaluado fue la liofilización. En este

procedimiento, la suspensión de cristales se lavó con agua fría y se cargó en viales de vidrios. El exceso de agua de la mezcla se separó después de la sedimentación de los cristales. Después, la suspensión se congeló a  $-50^{\circ}\text{C}$ . El secado primario y secundario se llevaron a cabo a  $-25^{\circ}\text{C}$  y  $0^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Estos cristales eran polvos que

- 5 fluían mejor y se disolvían fácilmente en sales de arginina 0,5 M tamponadas.
- [0176]** La calidad de la proteína en los cristales disueltos se evaluó usando SEC, SDS-SEC, IEX y los ensayos de bioactividad discutidos en los ejemplos 1 y 2. La Tabla 5 y las Figuras 11A-11B muestran que los cristales de Apo2L/TRAIL secados con los diferentes procedimientos permanecían bioquímicamente equivalentes a la
- 10 preparación de control líquida congelada no cristalizada.

Tabla 5

Procedimiento de secado	% de trímero por SEC	% de monómero por SDS-SEC	% de pico principal de IEX
Control (material de partida congelado)	98,0	96,8*	53,6
Secado a vacío con vibración - lavado con agua	97,4	98,1	54,9
Secado a vacío con vibración - lavado con etanol al 50%	97,7	97,5	53,7
Secado a vacío con vibración - lavado con etanol al 62,5%	97,9	97,5	53,4
Secado a vacío con vibración - lavado con etanol al 75%	97,7	97,7	52,8
Secado a vacío con vibración - lavado con etanol al 100%	97,8	98,0	53,3
* El % de monómero más bajo aparente en la muestra de control por SDS-SEC se debe a impurezas en el material de partida que eluyen simultáneamente con el dímero de Apo2L en SDS-SEC.			

- [0177]** Los datos sugieren que la cristalización de Apo2L/TRAIL y el posterior secado del material no afectan de forma adversa a la estructura o función de la proteína.
- 15 **EJEMPLO 9:** Formulación liofilizada de Apo2L/TRAIL que contiene cristales en sulfato sódico

**[0178]** Para evaluar la estabilidad al almacenamiento de Apo2L/TRAIL que

contienen cristales, se prepararon formulaciones liofilizadas con Apo2L/TRAIL cristalino (restos 114-281) en Tris 20 mM, pH 7-7,5, sulfato sódico 0,2-0,5 M, y Tween 20 al 0,01-0,005%. Las muestras se almacenaron a diferentes temperaturas durante hasta 4 meses. Después de reconstitución con agua estéril, se ensayó en las 5 formulaciones la estabilidad fisicoquímica usando ensayos de SEC, IEX y SDS-SEC descritos en los ejemplos 1 y 2. La tabla 6 resume los datos para una formulación de Apo2L/TRAIL 20 mg/ml en sulfato Na 0,2 M, Tris 20 mM, pH 7,2, Tween 20 al 0,01% después de 3 meses de almacenamiento.

Tabla 6

Temperatura	% de Trímero	% del pico principal de IEX	% de monómero
-70°C control líquido	99,3	56,1	99,1
Lio, 2-8°C, 3 meses	99,1	58,2	99,3
Lio, 30°C, 3 meses	97,0	56,4	98,3
Lio, 40°C, 3 meses	94,1	52,9	95,9
Lio, 50°C, 3 meses	90,1	44,8	91,7

10 **[0179]** Suponiendo una cinética de degradación de pseudoprimer orden, los perfiles de Arrhenius predicen una vida en almacenamiento significativamente más larga de 2 años para esta formulación a 2-8°C (véase la Figura 12). Estas preparaciones, aunque se cargan como disoluciones líquidas transparentes de Apo2L/TRAIL, cristalizan en diferentes grados durante la parte de congelación del ciclo de liofilización, demostrando que las formulaciones secadas que contienen 15 Apo2L/TRAIL cristalizada y sulfato sódico tienen estabilidad en el almacenamiento a largo plazo.

**EJEMPLO 10: Cristalización de Apo2L/TRAIL como procedimiento de recuperación y purificación**

20 **[0180]** La propensión a la cristalización de Apo2L/TRAIL en disoluciones de sulfato Na se usó como medio de purificación de la proteína Apo2L/TRAIL a partir de extractos de *E. coli*. El siguiente protocolo se puede usar para recuperar y purificar Apo2L/TRAIL recombinante sin efecto adverso en la calidad de la proteína.

**[0181]** El caldo de células enteras recogidas derivadas de *E. coli* (descrito en el 25 Ejemplo 1) se ajustó a pH 7,5 con Hepes 1,5 M (o Tris 1,5 M) y después se homogeneizó en un homogeneizador (Gaulin corporation, Everett, MA). El homogeneizado se acondicionó con DTT 5 mM y se flocluló con polietilenimina al

0,1% durante 1-2 horas. El material floculado se centrifugó con una centrífuga de alimentación continua BTPX205 (Alfa Laval Separation AB, Suecia) y se clarificó por filtración profunda. El lisado celular clarificado (extracto) se acondicionó con Triton-X100 hasta una concentración final de 0,05%. El lisado de células clarificado y  
5 acondicionado después se cargó en una columna de intercambio catiónico (resina de intercambio catiónico SP-Sepharosa FF, Amersham Pharmacia, Suecia) equilibrada en Hepes 50 mM (o Tris 50 mM)/Triton-X 100 al 0,05%/DTT 1 mM, pH 7,5. La Apo2L/TRAIL se unía a la columna mientras que las proteínas que no se unían fluían a través de la columna y se separaron lavando con tampón de equilibrado hasta que la  
10 absorbancia a 280 nm alcanzó el valor base. Después la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de NaCl 0,1 M en tampón de equilibrado. La Apo2L/TRAIL se eluyó por pasos usando NaCl 0,1 M (o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M) en Hepes, Tris y Trietanolamina 50 mM cada uno, Triton-X 100 al 0,05% y tampón de DTT 1 mM, pH 7,8.

**[0182]** La mezcla de Apo2L/TRAIL a temperatura ambiente recogida de la  
15 columna SP se puso en un tanque de acero inoxidable con una camisa de aislamiento para el calentamiento y enfriamiento. El tanque se equipó con una válvula cónica inferior y una de barrido con gases inferior para la máxima recuperación de la proteína cristalizada. La mezcla se agitó usando una rueda de paletas de tipo marino en condiciones de mezcla moderadas. Se usó un dispositivo deslizante de control de  
20 temperatura para subir linealmente la temperatura desde aproximadamente 25°C a aproximadamente 4°C en el transcurso de 1 hora. Se observó la cristalización espontánea unos minutos después de que la mezcla alcanzara 4°C. Después de más de 12 horas en estas condiciones, la cristalización se había completado ya que la solubilidad en equilibrio estaba casi establecida. Los cristales después se capturaron en  
25 un equipo de filtración que contenía una frita de polipropileno 20 µm. Después de la deposición de cristales en la superficie del filtro, los cristales se lavaron con Tris 20-50mM enfriado, a pH 7,5. Después se usó un volumen igual de tampón de lavado comparado con el volumen de mezcla de Apo2L/TRAIL de SP para separar las aguas madres residuales (líquido sobrenadante) de los cristales depositados. Después del  
30 lavado, los cristales se disolvieron en sulfato sódico 100 mM/Tris 20 mM a pH 7,5 por recirculación del tampón de disolución a través del lecho de cristales a aproximadamente 30°C. La disolución de los cristales se observó en aproximadamente 4 horas. La Apo2L/TRAIL purificada y disuelta después se esterilizó por filtración a un envase y se almacenó congelada a -70°C.

35 **[0183]** La pureza de las preparaciones de Apo2L/TRAIL se determinó por los

ensayos de ELISA de proteína de *E. coli* (ECP) total, ensayo de lisado de amebocito de Limulus (LAL), y tinción con plata de SDS-PAGE. El ELISA de ECP se llevó a cabo por inmovilización de anticuerpos anti-ECP entera de cabra purificados por afinidad en pocillos de placas de microvaloración, incubación de las muestras y después conjugación de ECP con peroxidasa de rábano picante. La actividad enzimática de la peroxidasa se cuantificó con o-fenilendiamina leyendo la absorbancia a 490 nm en un lector de placa de microvaloración. El nivel de endotoxinas se determinó usando el ensayo de lisis de aglomerados de amebocitos de Limulus. La tinción con plata de SDS-PAGE se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida de gradiente de 10 a 20% (Daiichi Pure Chemicals) en tampón de Tris-glicina que contenía SDS al 0,1%. La electroforesis se llevó a cabo con una corriente constante de 50 mA hasta que el frente del colorante llegó cerca de la parte inferior del gel. Los geles se fijaron y se tiñeron por los procedimientos de azul brillante Coomassie o plata de Merril.

**[0184]** La calidad de la proteína se evaluó por SEC, SDS-SEC, IEX, y la bioactividad según los procedimientos descritos en los ejemplos 1 y 2.

**[0185]** La pureza y la calidad de Apo2L/TRAIL recuperada usando el procedimiento de cristalización anterior a una escala de fermentación de 60 litros, se muestra en la Tabla 7. Para la comparación, también se muestra un patrón de referencia purificado por un procedimiento de 3 etapas cromatográficas como se describe en el ejemplo 1.

Tabla 7

Prep. de Apo2L/TRAIL	Pureza de la proteína			Calidad de la proteína			
	ECP (ppm)	LAL (EU/mg)	SDS-PAGE	% de trímero por SEC	% de monómero por SDS-SEC	% de bioactividad del control ( $\pm$ 20%)	% del pico principal de IEX
Apo2L/TRAIL purificada por cristalización	10	0,034	No hay banda a 10kDa	99,0	99,0	126	63
Material de referencia purificado por cromatografía estándar	0,82	0,023	Banda a ~10kDa	98,9	98,9	86	61

**[0186]** Como se muestra en la Tabla 7 y la Figura 13, la preparación de

Apo2L/TRAIL a una escala de fabricación tenía un alto grado de pureza adecuado para el uso terapéutico. En particular, una proteína de unión al ADN de E. coli de 10 kDa que tiende a copurificar con Apo2L/TRAIL, se separó por el procedimiento de cristalización. Los datos indican que la proteína Apo2L/TRAIL purificada en “una  
5 etapa de columna” se puede tratar por cristalización y tiene una pureza comparable o menor que la de la proteína Apo2L/TRAIL purificada por el procedimiento de purificación de 3 columnas descrito en el ejemplo 1. La figura 14 muestra el efecto del tipo de sal en la cristalización de una Apo2L/TRAIL purificada por una etapa de columna. Se observó el “envenenamiento” de la cristalización por cationes divalentes  
10 para la Apo2L/TRAIL parcialmente purificada (Fig. 14), similar al observado para >99% de Apo2L/TRAIL purificada mostrado en la Figura 9.

**[0187]** La cristalización de la Apo2L/TRAIL parcialmente purificada tampoco afectaba de forma adversa a las propiedades bioquímicas de Apo2L/TRAIL (véase la Tabla 7). Los datos sugieren que la cristalización de Apo2L/TRAIL expresada de  
15 forma recombinante, cuando está en un estado parcialmente purificado, puede ser un medio eficaz, eficiente y barato para su purificación. Opcionalmente, dichos cristales después se pueden usar para preparar un volumen seco para el almacenamiento o formulaciones de liberación controlada como se describe en los ejemplos 8 y 9.

**[0188]** La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones  
20 específicas descritas en el presente documento. Realmente, diferentes modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras que acompañan. Dichas modificaciones se pretende que estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Una formulación estable de ligando Apo-2, que comprende el ligando Apo-2 y sal de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, en la que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 y la sal es una sal de arginina o sulfato sódico.  
5
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicha sal es sal de arginina.  
10
3. La formulación de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la concentración de dicha sal de arginina en la formulación es de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,5 M.
- 15 4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la sal de arginina se selecciona del grupo que consiste en succinato de arginina, sulfato de arginina, malato de arginina, citrato de arginina, tartrato de arginina y fosfato de arginina.
- 20 5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la sal de arginina es succinato de arginina.
6. La formulación de la reivindicación 1, en la que la sal es sulfato sódico.
- 25 7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el ligando Apo-2 comprende proteína cristalizada.
8. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha formulación está liofilizada.  
30
9. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el pH de dicha formulación es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5.
10. La formulación de la reivindicación 9, en la que el pH de dicha formulación es de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5.  
35

11. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la concentración del ligando Apo-2 es de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml.
- 5
12. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho Apo-2 comprende los aminoácidos 114 a 281 del SEQ ID NO: 1 (Figura 1).
13. La formulación de la reivindicación 12, en la que dicho ligando Apo-2 no  
10 está unido o fusionado a un marcador de epítipo.
14. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha formulación comprende además tensioactivo.
- 15 15. La formulación de la reivindicación 14, en la que dicho tensioactivo es un polisorbato o poloxámero.
16. La formulación de la reivindicación 14, en la que la concentración de dicho tensioactivo en la formulación es de aproximadamente 0,005% a  
20 aproximadamente 0,2%.
17. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha formulación comprende además tampón.
18. La formulación de la reivindicación 17, en la que dicho tampón es el  
25 tampón Tris.
19. La formulación de la reivindicación 18, en la que el pH de la formulación es de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5.
- 30 20. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha formulación además comprende uno o más iones metálicos divalentes.
21. La formulación de la reivindicación 20, en la que dicho uno o más iones metálicos divalentes son cinc.

22. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un conservante.
23. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la  
5 que dicha formulación es estable en almacenamiento durante al menos 12 meses.
24. La formulación de la reivindicación 23, en la que dicha formulación es estable al almacenamiento durante al menos 24 meses.
- 10 25. Una formulación de ligando Apo-2 liofilizada y estable, que comprende ligando Apo-2 de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, sal de arginina de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, tampón y tensioactivo, en la que dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9.
- 15 26. La formulación de la reivindicación 25, en la que dicha sal de arginina es succinato de arginina.
27. La formulación de la reivindicación 26, en la que la concentración de dicho succinato de arginina es de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,5 M.
- 20 28. La formulación de la reivindicación 25, en la que dicho tampón es tampón de Tris.
29. La formulación de la reivindicación 25, en la que dicho tensioactivo es un  
25 polisorbato.
30. La formulación de la reivindicación 25, en la que dicho ligando Apo-2 comprende los aminoácidos 114-281 del SEQ ID NO: 1 (Figura 1).
- 30 31. La formulación de la reivindicación 25, en la que dicha formulación comprende además uno o más iones metálicos divalentes.
32. Una formulación estable de ligando Apo-2, que comprende ligando Apo-2 de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, sulfato sódico de  
35 aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, tampón y tensioactivo, en la que

dicho ligando Apo-2 comprende proteína cristalizada y dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9.

33. La formulación de la reivindicación 32, en la que dicho tampón es tampón  
5 de Tris.

34. La formulación de la reivindicación 32, en la que dicho tensioactivo es  
polisorbato.

10 35. La formulación de la reivindicación 32, en la que dicha formulación tiene  
un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5.

36. Un procedimiento para hacer una formulación estable de ligando Apo-2,  
que comprende las etapas de (a) proporcionar ligando Apo-2 de aproximadamente 1  
15 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, sal de arginina o sulfato sódico de  
aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, tampón y tensioactivo, (b)  
combinar o mezclar los ingredientes de la etapa (a) para hacer una formulación, y (c)  
ajustar el pH de la formulación de la etapa (b) de aproximadamente 6 a  
aproximadamente 9.

20

37. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que dicha sal de arginina es  
succinato de arginina.

38. El procedimiento de la reivindicación 37, en el que la concentración de  
25 dicho succinato de arginina es de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 0,5 M.

39. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que dicho tampón es  
tampón de Tris.

30 40. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que dicho tensioactivo es  
un polisorbato.

41. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que dicho ligando Apo-2  
comprende los aminoácidos 114 a 281 del SEQ ID NO: 1 (Figura 1).

35

42. Un dispositivo para administrar una formulación de ligando Apo-2 a un mamífero, que comprende un envase que contiene al menos una unidad de dosificación de la formulación de ligando Apo-2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.
- 5 43. El dispositivo de la reivindicación 42, en el que dicho dispositivo es un dispositivo inyector de tipo bolígrafo.
44. El dispositivo de la reivindicación 42, en el que el envase es un cartucho.
- 10 45. Un artículo fabricado que comprende un envase que incluye la formulación de Apo2L/TRAIL de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, e instrucciones impresas para usar dicha formulación de Apo2L/TRAIL.
46. El artículo fabricado de la reivindicación 45, en el que dicho envase es una  
15 botella, vial, jeringa o tubo de ensayo.
47. El artículo fabricado de la reivindicación 45, que comprende un segundo envase que incluye agua para inyección, disolución salina de Ringer o disolución de dextrosa.
- 20 48. Un procedimiento in vitro de inducción de apoptosis en células de mamífero, que comprende exponer las células de mamífero a una cantidad eficaz de la formulación de ligando Apo-2 de la reivindicación 1, 25 o 32.
- 25 49. El procedimiento de la reivindicación 48, en el que dichas células de mamífero son células de cáncer.
50. Una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, para usar en el tratamiento del cáncer en un mamífero.
- 30 51. Uso de una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer en un mamífero.

1 TTTCCCTCACTATAAAAAGAATAGAGAAGGAGGGCTTACGTACCGGCTGCCTGGCTGACTTACAGCAGCTCAGACTCTGACAGGATC  
 1 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGACCCAGCCTGGGACAGACCTGGCTGATCGTGATCTTACACAGTGTCTCCTGCAGTCTCTCTGT  
 3 MetAlaMetMetGluValGlnGlyProSerLeuGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys  
 181 GTGGCTGTAACTTACGTGTACTTTACCAACGAGCTGAAGCAGATCGAGGACAGTACTCCAAAAGTGGCATTTGCTTGTCTTAAAGAA  
 31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPheLeuLysGlu  
 271 GATGACAGTTATTTGGGCCCAATGACGAGAGATGAACAGCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAGCTCGTTAGAAAG  
 61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys  
 361 ATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCAATTTCTACAGTTCAAGAAAAGCAACAAAATATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAAGAGGTCCNCAG  
 91 MetIleLeuArgThrSerGluGluThrIleSerThrValGlnGluLysGlnGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln  
 451 AGAGTAGCAGCTCACATAACTGGACCAGAGGAAGCAACACATTGTCTTCCAAACTCCAAGAATGAAAAGGCTCTGGGCCGCAAA  
 121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys  
 541 ATAACTCCTGGGATCATCAAGGAGTGGGCATTCATTCCTGAGCAACTTGCACCTTGAGGAATGGTGAACCTGCATCCATGAAAAAGGG  
 151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly  
 631 TTTTACTACATCTATCCCAACATACTTTTCGATTTTCAGGAGGAATAAAGAAAACACAAAGACAAACAATAATGGTCCCAATATATT  
 181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle  
 721 TACAAATACACAAGTTATCCTGACCCTATATTGTTGATGAAAAGTGCTAGAATAAGTTGTTGGTCTAAAAGATGCAGAAATATGGACTCTAT  
 211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr  
 811 TCCATCTATCAAGGGGAATATTTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAAATTTTGTCTTAACAATGAGCACTTGATAGACATGGACCAT  
 241 SerIleTyrGlnGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis  
 901 GAAGCCAGTTTTTTCGGGCCCTTTTAGTTGGCTAACCTGGAAGAAAAGCAATAACCTCAAAGTGACTATTTCAGTTTTTCAGGAT  
 271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp  
 991 GATACACTATGAAGATGTTTCAAAAAAATCTGACCACAAAACAACAGAAA

**FIG.-1**

Figura 2 - Estabilidad de Apo2L/TRAIL líquido en diferentes preparaciones después de 1 semana de almacenamiento a 30°C.

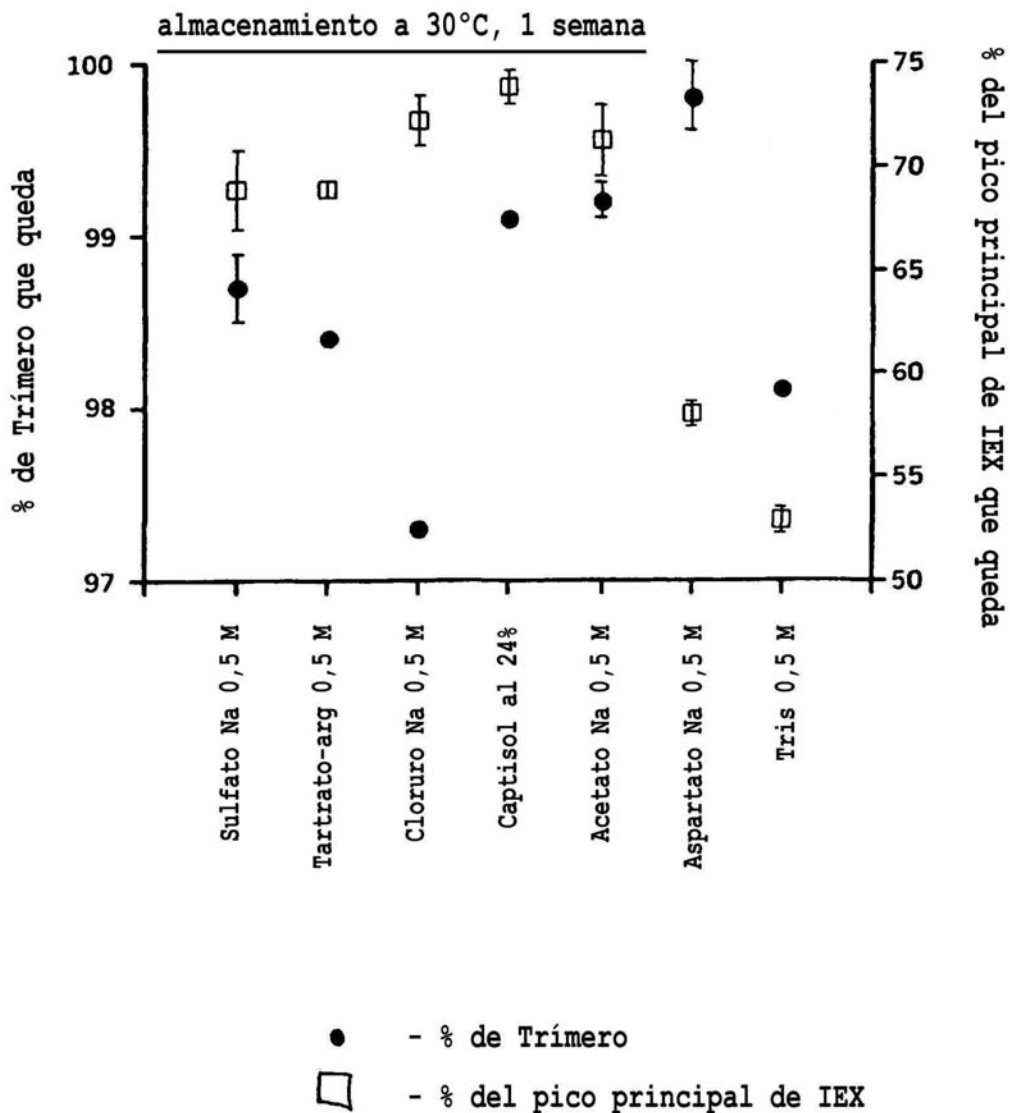


Figura 3A - Estabilidad de preparaciones liofilizadas de Apo2L/TRAIL después de 4 meses de almacenamiento a 40°C

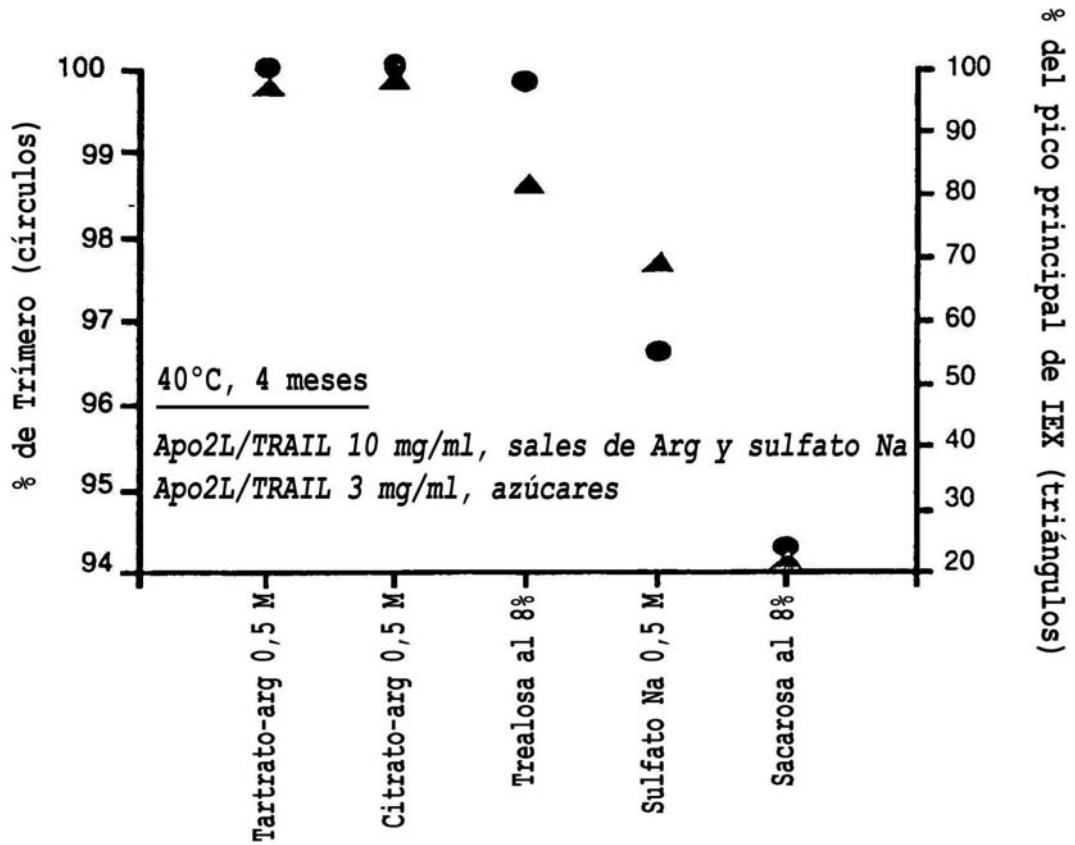


Figura 3B - Estabilidad de diferentes formulaciones liofilizadas de Apo2L/TRAIL que contienen sal de arginina después de 1 mes de almacenamiento a 50°C.

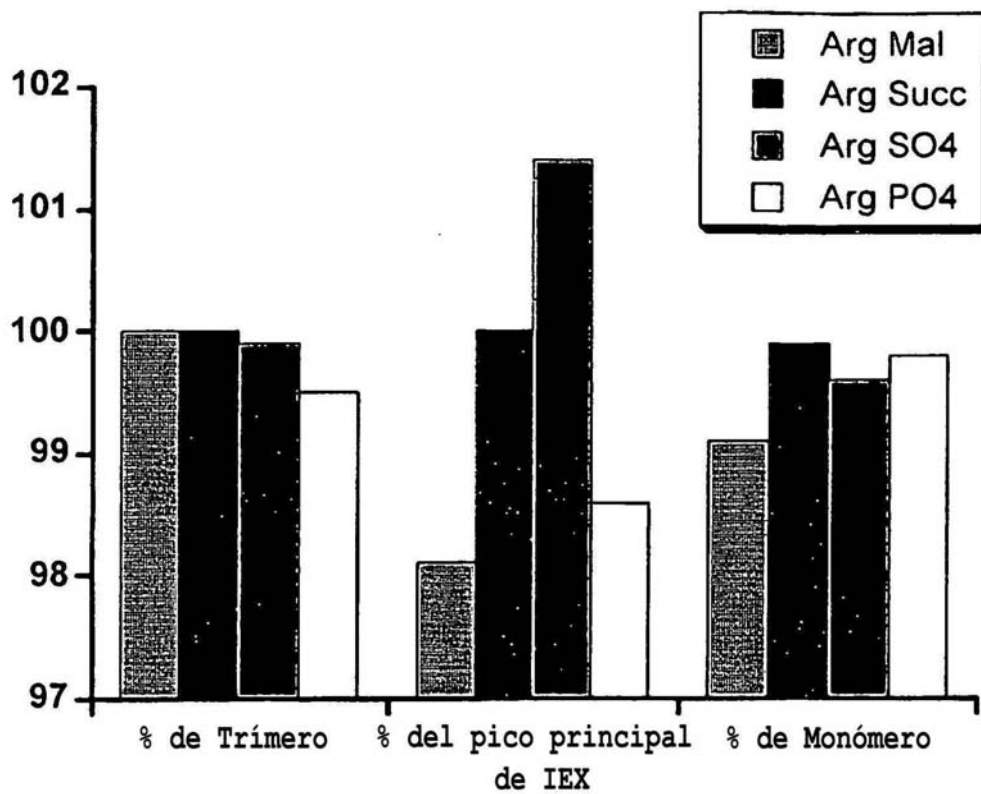


Figura 3C - Perfil de Arrhenius de una formulación liofilizada de Apo2L/TRAIL 10 mg/ml en tartrato de arginina 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,0, polisorbato 20 al 0,01%, sulfato Zn 0,33 mM

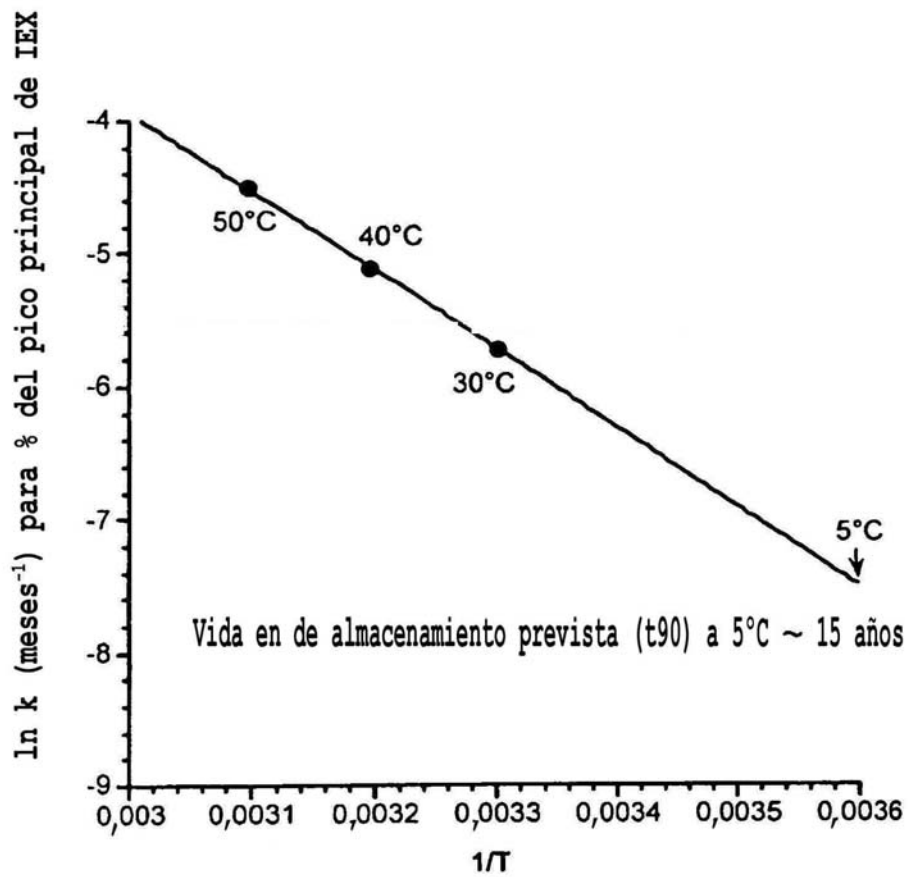


Figura 4 - Perfil de estabilidad de pH de Apo2L/TRAIL

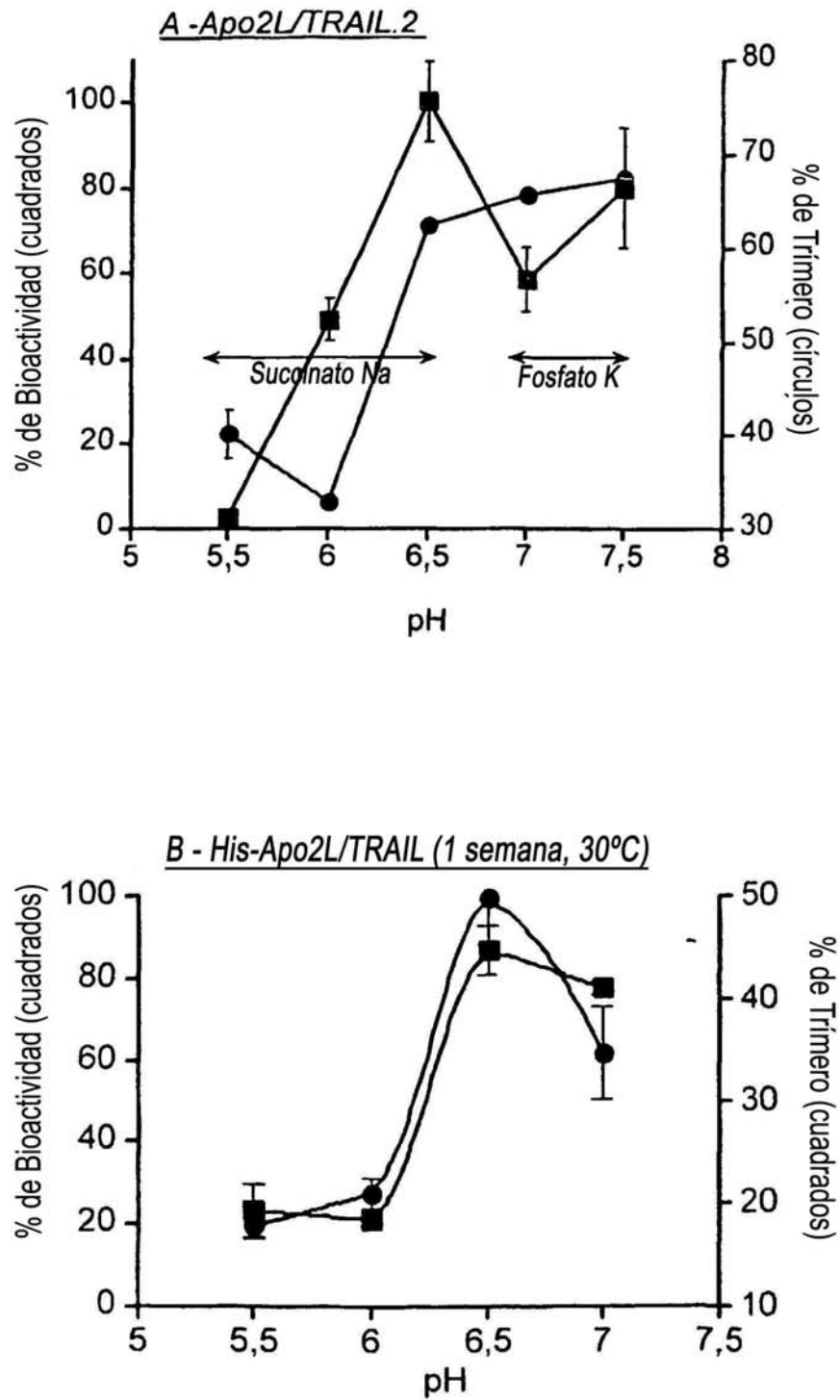


Figura 5 - Coordinación del Zn a Apo2L/TRAIL y efecto del pH

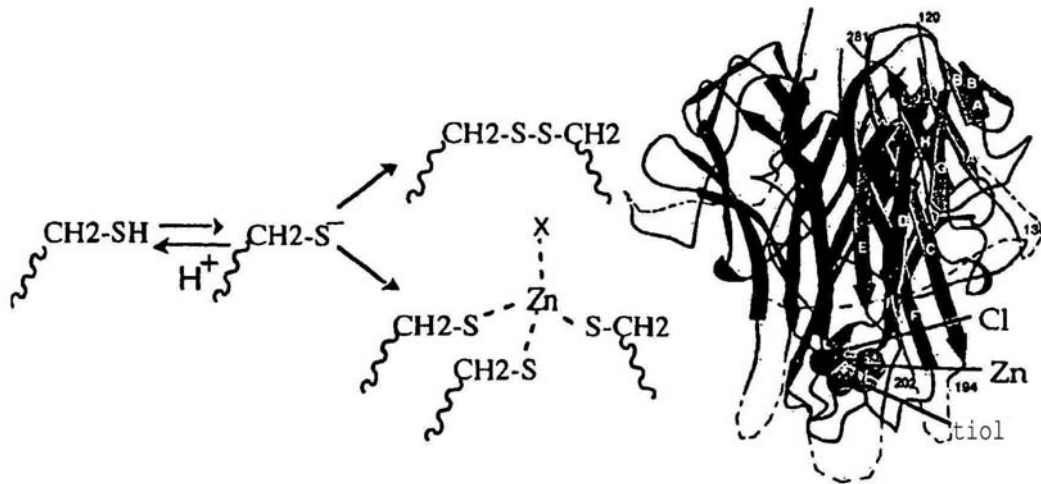


Figura 6 - Efecto del polisorbato (Tween) 20 en la estabilización de Apo2L/TRAIL

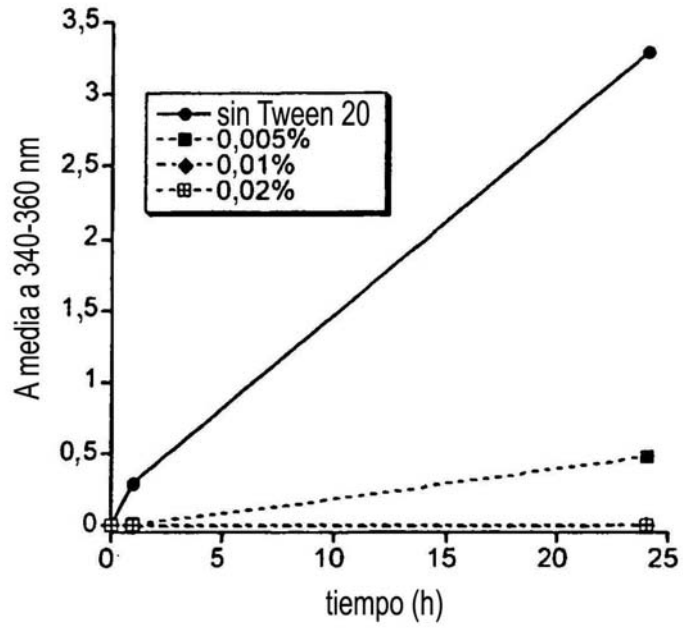


Figura 7 - Efecto del Zn en la estabilización térmica de Apo2L/TRAIL después de 2 meses de almacenamiento en forma de una formulación líquida que contiene tartrato de arginina 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,0.

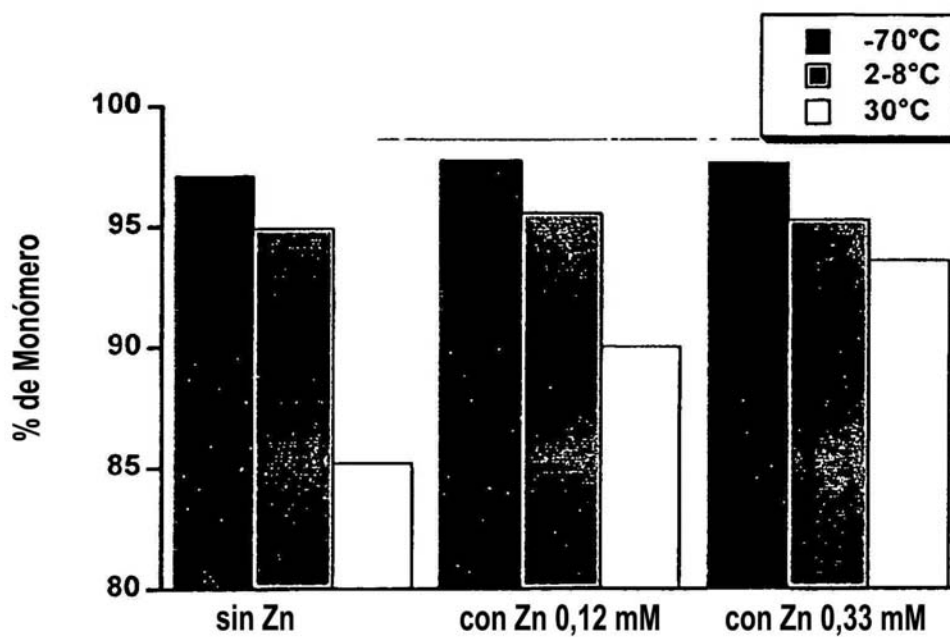


Figura 8 - Cristalización de Apo2L/TRAIL en formulaciones de sulfato sódico

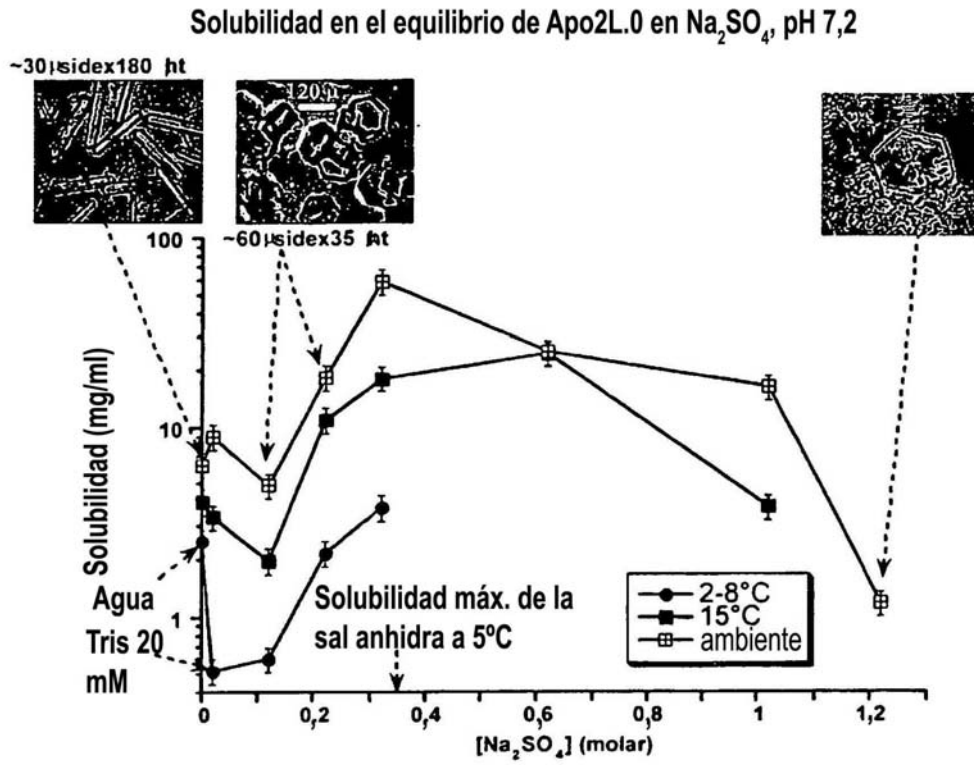


Figura 9 - Cristalización de Apo2L/TRAIL dependiente de iones. Se observó cristalización en todas las sales, pero las sales de arginina y Mg maximizaron la solubilidad de la proteína en el intervalo estrecho de conductividad de 10-11,5 mS/cm

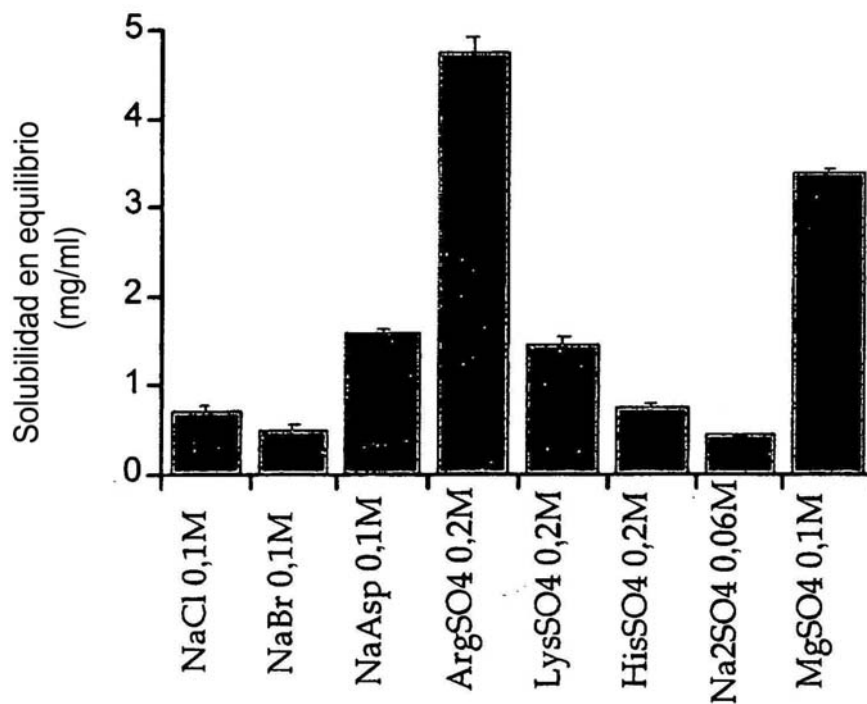


Figura 10a - Efecto de la velocidad de agitación (líneas negras) en la cristalización de Apo2L/TRAIL. También se presenta el muestreo de temperatura durante el ciclo de enfriamiento (líneas de trazos)

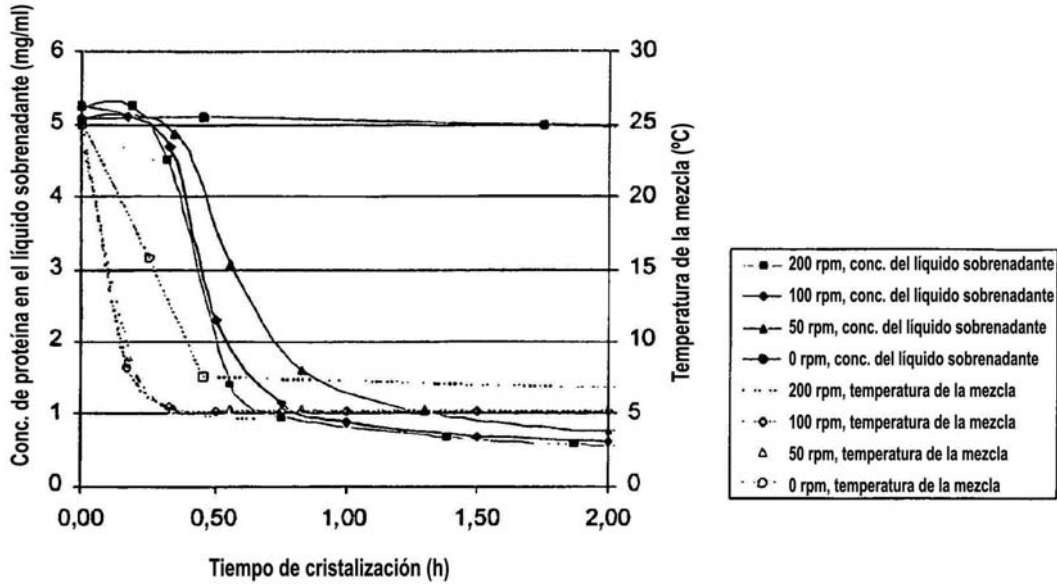


Figura 10b - Efecto de la velocidad de agitación en la disolución de cristales de Apo2L/TRAIL (líneas negras). También se presenta el muestreo de temperatura durante el ciclo de calentamiento (líneas de trazos)

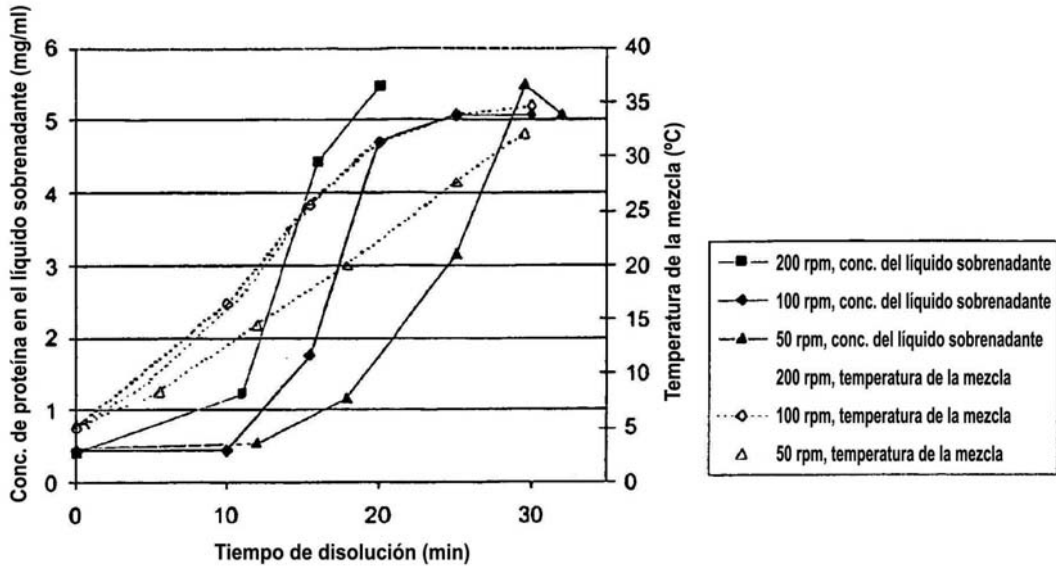


Figura 10c - Efecto de la velocidad de agitación en la distribución del tamaño de los cristales de Apo2L/TRAIL

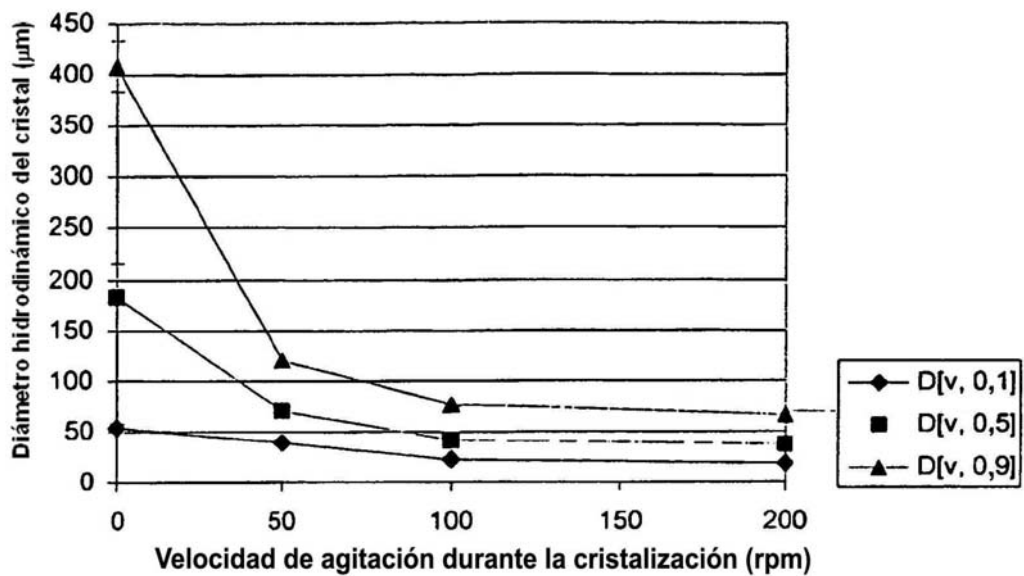


Figura 11a - Perfil de Apo2L/TRAIL de IEX después de reconstitución de los cristales secados a vacío

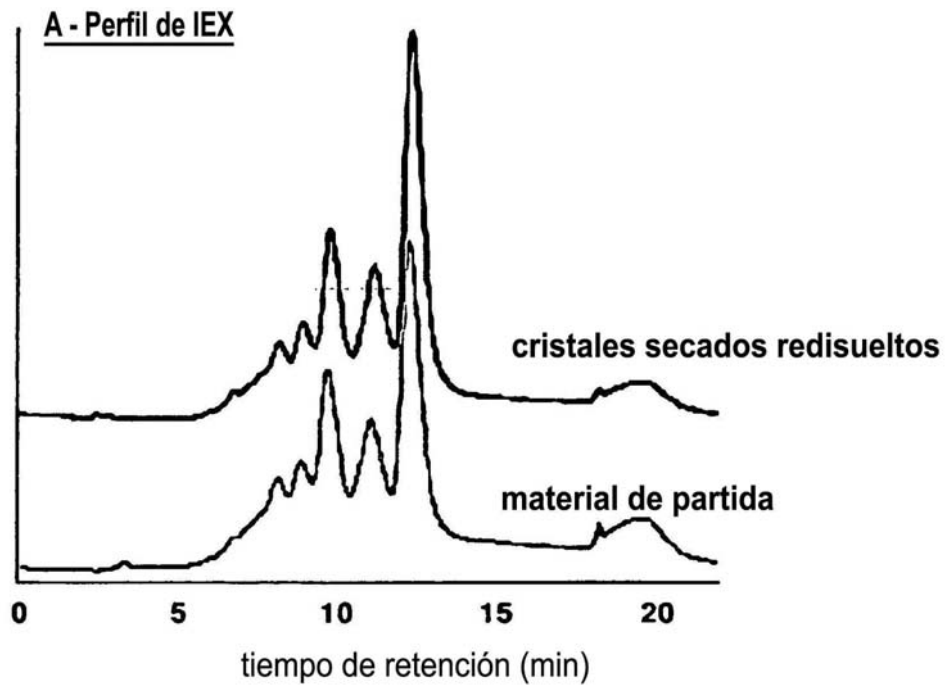


Figura 11b - Bioactividad de Apo2L/TRAIL después de reconstitución de los cristales secados a vacío

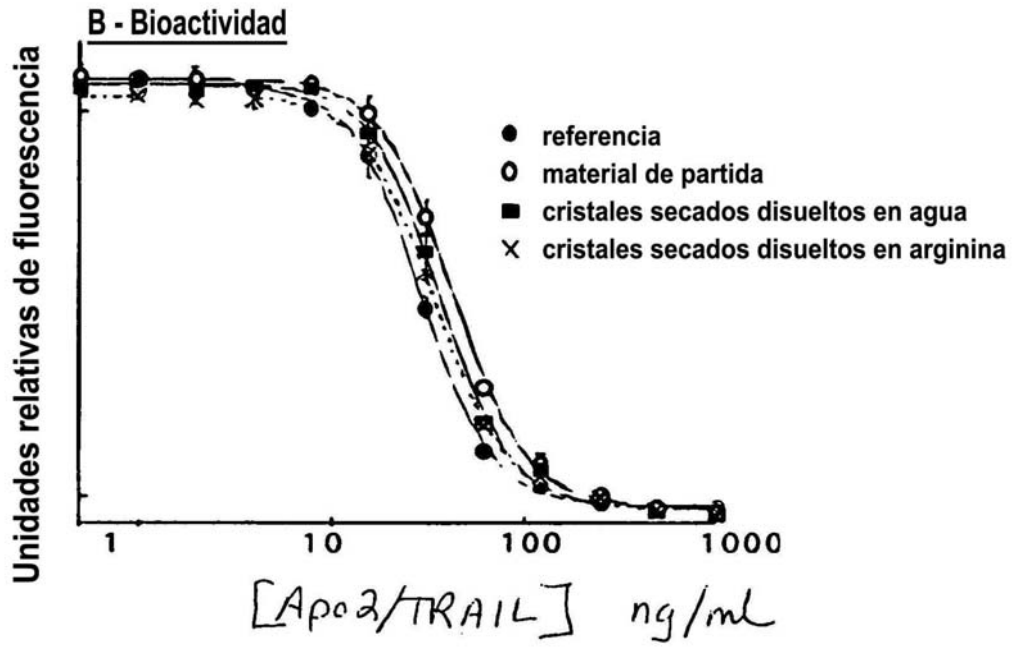


Figura 12 - Perfil de Arrhenius de una formulación liofilizada de Apo2L/TRAIL 20 mg/ml en sulfato Na 0,2 M, Tris 20 mM, pH 7,2, Tween 20 al 0,01%

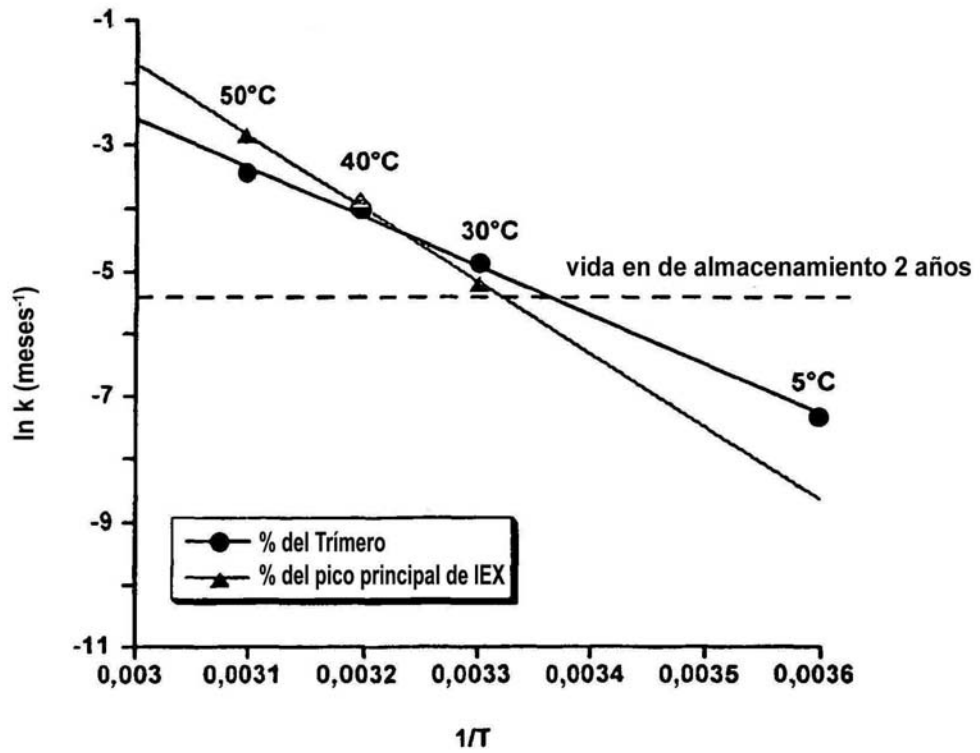


Figura 13 - Pureza por tinción con plata de SDS-PAGE de Apo2L/TRAIL purificada por cristalización comparada con un material de referencia purificado por 3 etapas de columna

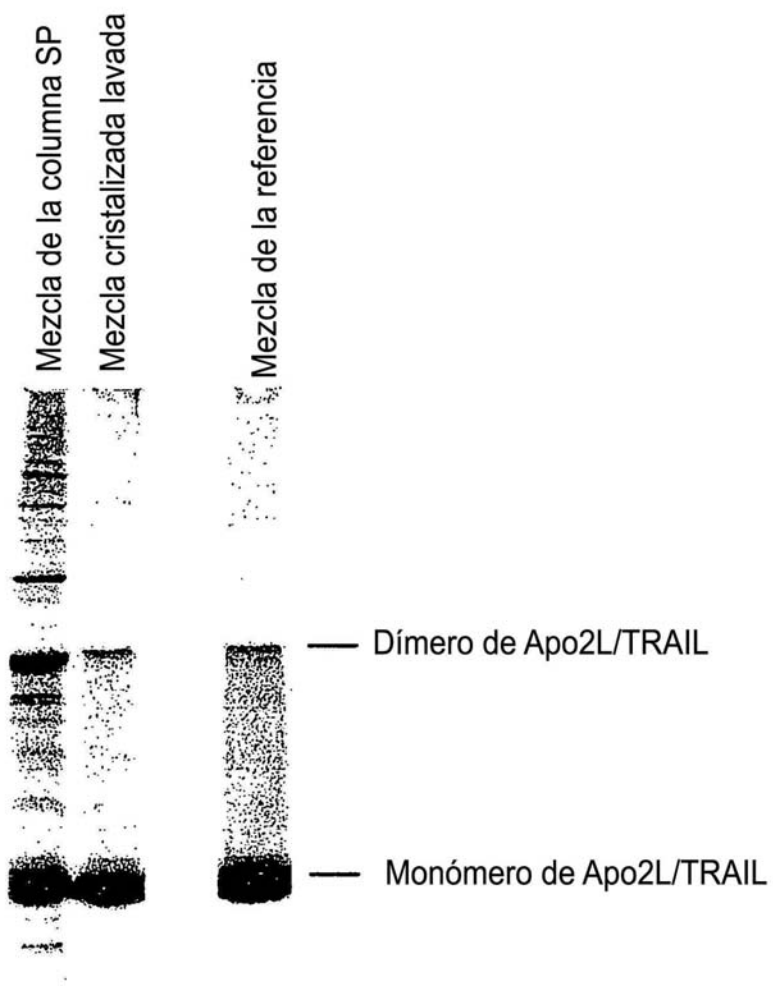
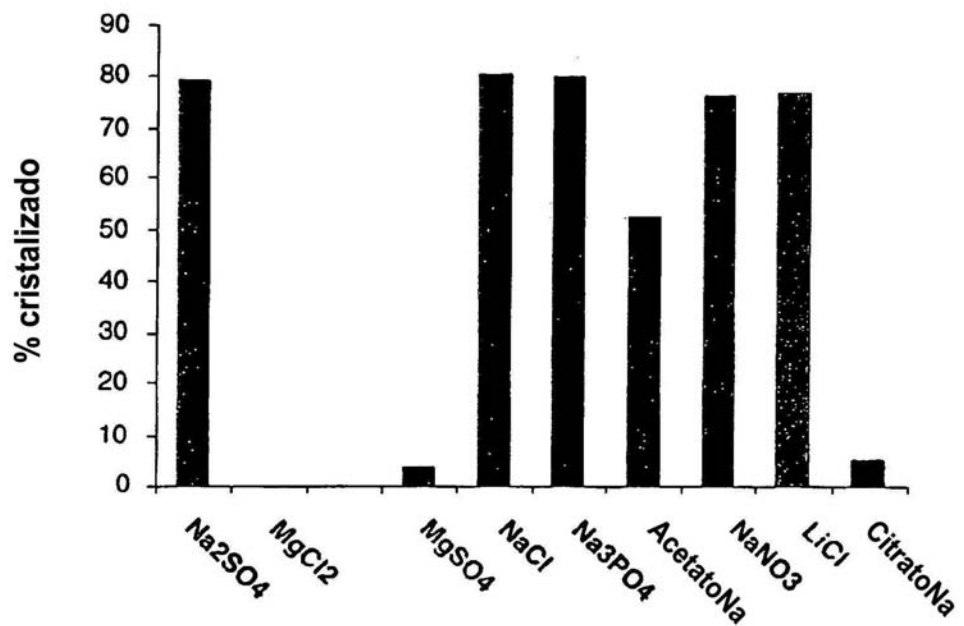


Figura 14 - Efecto del tipo de sal en la cristalización de Apo2L/TRAIL parcialmente purificada. Después de purificación parcial de los lisados clarificados de *E. coli* en columna de intercambio catiónico SP-Spharosa, la proteína se eluyó a 5-10 mg/ml en Tris 20 mM, pH 8 y una de las sales mostradas 0,2 M. Las muestras se almacenaron a 2-8°C durante 3-7 días. Después se filtró una parte alícuota y se midió la concentración de proteína soluble por barrido de espec. UV.



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el  
 5 máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- 10 • WO 9701633 A [0002] [0028] [0029] [0030] [0056] [0125]
- WO 9725428 A [0002] [0028] [0029] [0030] [0056] [0066] [0074] [0076] [0085] [0125]
- WO 9828426 A [0002] [0028]
- WO 9846751 A [0002] [0028]
- 15 • WO 9818921 A [0002] [0028]
- EP 417563 A [0006]
- WO 9832856 A [0009]
- WO 9851793 A [0010] [0056]
- WO 9841629 A [0010]
- 20 • WO 9835986 A [0010]
- EP 870827 A [0010]
- WO 9846643 A [0010]
- WO 9902653 A [0010]
- WO 9909165 A [0010]
- 25 • WO 991179 A [0010]
- WO 0100832 A [0029] [0056] [0071] [0072] [0090] [0139] [0157] [0158] [0160]
- WO 9858062 A [0056]
- WO 9910484 A [0056]
- WO 0122987 A [0056] [0125]
- 30 • US 5364934 A [0069]
- EP 117060 A [0082]
- EP 117058 A [0082]
- DD 266710 [0083]
- WO 8905859 A [0088]
- 35 • WO 9100358 A [0088]
- US 4399216 A [0089]
- US 5370629 A [0116]
- EP 257956 A [0126]
- US 3773919 A [0128]
- 40 • EP 58481 A [0128]
- EP 133988 A [0128]

**Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción**

- Gruss; Dower. *Blood*, 1995, vol. 85, 3378-3404 [0002] [0028]
- Schmid et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986, vol. 83, 1881 [0002]
- Dealtry et al. *Eur. J. Immunol.*, 1987, vol. 17, 689 [0002]
- Pitti et al. *J. Biol. Chem*, 1996, vol. 271, 12687-12690 [0002]
- 5 • Wiley et al. *Immunity*, 1995, vol. 3, 673-682 [0002] [0003] [0028]
- Browning et al. *Cell*, 1993, vol. 72, 847-856 [0002] [0028]
- Armitage et al. *Nature*, 1992, vol. 357, 80-82 [0002] [0028]
- Marsters et al. *Curr. Biol.*, 1998, vol. 8, 525-528 [0002] [0028]
- Chicheportiche et al. *Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 32401-32410 [0002] [0028]
- 10 • Hahne et al. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 1185-1190 [0002] [0028]
- Moore et al. *Science*, 1999, vol. 285, 260-263 [0002] [0028]
- Shu et al. *J. Leukocyte Biol.*, 1999, vol. 65, 680 [0002] [0028]
- Schneider et al. *J. Exp. Med.*, 1999, vol. 189, 1747-1756 [0002] [0028]
- Mukhopadhyay et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 15978-15981 [0002] [0028]
- 15 • Pitti et al. *J. Biol. Chem*, 1996, vol. 271, 12697-12690 [0003]
- Mariani et al. *Cell. Biol.*, 1997, vol. 137, 221-229 [0003]
- Hymowitz et al. *Molec. Cell*, 1999, vol. 4, 563-571 [0003]
- Hymowitz et al. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, 633-644 [0003]
- Bodmer et al. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 20632-20637 [0003]
- 20 • Thomas et al. *J. Immunol.*, 1998, vol. 161, 2195-2200 [0004]
- Johnsen et al. *Cytokine*, 1999, vol. 11, 664-672 [0004]
- Griffith et al. *J. Exp. Med.*, 1999, vol. 189, 1343-1353 [0004]
- Song et al. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 191, 1095-1103 [0004]
- Jeremias et al. *Eur. J. Immunol.*, 1998, vol. 28, 143-152 [0004]
- 25 • Katsikis et al. *J. Exp. Med*, 1997, vol. 186, 1365-1372 [0004]
- Miura et al. *J. Exp. Med*, 2001, vol. 193, 651-660 [0004]
- Rieger et al. *FEBS Letters*, 1998, vol. 427, 124-128 [0005]
- Ashkenazi et al. *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 104, 155-162 [0005]
- Walczak et al. *Nature Med.*, 1999, vol. 5, 157-163 [0005]
- 30 • Keane et al. *Cancer Research*, 1999, vol. 59, 734-741 [0005]
- Mizutani et al. *Clin. Cancer Res.*, 1999, vol. 5, 2605-2612 [0005]
- Gazitt. *Leukemia*, 1999, vol. 13, 1817-1824 [0005]
- Yu et al. *Cancer Res*, 2000, vol. 60, 2389 [0005]
- Chinnaiyan et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, vol. 97, 1754-1759 [0005]
- 35 • Gliniak et al. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 6153-6158 [0005]
- Roth et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1999, vol. 265, 1999 [0005]
- Jo et al. *Nature Med.*, 2000, vol. 6, 564-567 [0005]
- Nagata. *Nature Med*, 2000, vol. 6, 502-503 [0005]
- Lawrence et al. *Nature Med.*, Letter to the Editor, 2001, vol. 7, 383-385 [0005]
- 40 • Qin et al. *Nature Med.*, Letter to the Editor, 2001, vol. 7, 385-386 [0005]
- Hohman et al. *J. Biol. Chem*, 1989, vol. 264, 14927-14934 [0006]
- Brockhaus et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, vol. 87, 3127-3131 [0006]
- Loetscher et al. *Cell*, 1990, vol. 61, 351 [0006]
- Schall et al. *Cell*, 1990, vol. 61, 361 [0006]
- 45 • Smith et al. *Science*, 1900, vol. 248, 1019-1023 [0006]

- Lewis et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1991, vol. 88, 2830-2834 [0006]
- Goodwin et al. Mol. Cell. Biol, 1991, vol. 11, 3020-3026 [0006]
- Nophar, Y. et al. EMBO J., 1990, vol. 9, 3269 [0006]
- Kohno, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1990, vol. 87, 8331 [0006]
- 5 • Hale et al. J. Cell. Biochem. Supplement 15F, 1991, vol. 113, 424 [0006]
- Banner et al. Cell, 1993, vol. 73, 431-435 [0007]
- Johnson et al. Cell, 1986, vol. 47, 545 [0007]
- Radeke et al. Nature, 1987, vol. 325, 593 [0007]
- Stamenkovic et al. EMBO J., 1989, vol. 8, 14.03 [0007]
- 10 • Mallet et al. EMBO J., 1990, vol. 9, 1063 [0007]
- Itoh et al. Cell, 1991, vol. 66, 233-243 [0007]
- Upton et al. Virology, 1987, vol. 160, 20-29 [0007]
- Smith et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991, vol. 176, 335 [0007]
- Upton et al. Virology, 1991, vol. 184, 370 [0007]
- 15 • Pan et al. Science, 1997, vol. 276, 111-113 [0009] [0011]
- Sheridan et al. Science, 1997, vol. 277, 818-821 [0010] [0011]
- Pan et al. Science, 1997, vol. 277, 815-818 [0010]
- Screatton et al. Curr. Biol., 1997, vol. 7, 693-696 [0010]
- Walczak et al. EMBO J., 1997, vol. 16, 5386-5387 [0010]
- 20 • Wu et al. Nature Genetics, 1997, vol. 17, 141-143 [0010]
- Hymowitz et al. Molecular Cell, 1999, vol. 4, 563-571 [0010]
- McFarlane et al. J. Biol. Chem, 1997, vol. 272, 25417-25420 [0011]
- Schneider et al. FEBS Letters, 1997, vol. 416, 329-334 [0011]
- Degli-Esposti et al. J. Exp. Med., 1997, vol. 186, 1165-1170 [0011]
- 25 • Mongkolsapaya et al. J. Immunol., 1998, vol. 160, 3-6 [0011]
- Marsters et al. Curr. Biol., 1997, vol. 7, 1003-1006 [0011]
- Pan et al. FEBS Letters, 1998, vol. 424, 41-45 [0011]
- Degli-Esposti et al. Immunity, 1997, vol. 7, 813-820 [0011]
- Pitti et al. Nature, 1998, vol. 396, 699-703 [0011]
- 30 • Kischkel et al. Immunity, 2000, vol. 12, 611-620 [0012]
- Sprick et al. Immunity, 2000, vol. 12, 599-609 [0012]
- Bodmer et al. Nature Cell Biol., 2000, vol. 2, 241-243 [0012]
- Ashkenazi ; Dixit. Science, 1998, vol. 281, 1305-1308 [0013]
- Ashkenazi ; Dixit. Curr. Opin. Cell Biol., 2000, vol. 11, 255-260 [0013]
- 35 • Golstein. Curr. Biol., 1997, vol. 7, 750-753 [0013]
- Nagata. Cell, 1997, vol. 88, 355-365 [0013]
- Locksley et al. Cell, 2001, vol. 104, 487-501 [0013]
- Pitti et al. J. Biol. Chem., 1996, vol. 271, 12687-12690 [0028]
- Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience
- 40 Publishers, 1995 [0041]
- Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0043]
- Agnew. Chem Intl. Ed. Engl., 1994, vol. 33, 183-186 [0054]
- Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs. Murakami et al. The
- 45 Molecular Basis of Cancer. WB Saunders, 1995, 13 [0055]

- Marsters et al. *Curr. Biology*, 1996, vol. 6, 1669 [0056]
- Nicoletti et al. *J. Immunol. Methods*, 1991, vol. 139, 271-279 [0057]
- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0067]
- 5 • Dieffenbach et al. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995 [0067]
- Cunningham et al. *Science*, 1989, vol. 244, 1081 [0070]
- Creighton. *The Proteins*. W.H. Freeman & Co, [0070]
- Chothia. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 150, 1 [0070]
- 10 • Messing et al. *Nucleic Acids Res.*, 1981, vol. 9, 309 [0080]
- Maxam et al. *Methods in Enzymology*, 1980, vol. 65, 499 [0080]
- Gething et al. *Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0082]
- Mantei et al. *Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0082]
- Shaw et al. *Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0088]
- 15 • Graham; van der Eb. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0089]
- Van Solingen et al. *J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0089]
- Hsiao et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 3829 [0089]
- Keown et al. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0089]
- Mansour et al. *Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0089]
- 20 • *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*. IRL Press, 1991 [0092]
- Thomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0093]
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0110]
- Moore. *AIChE Practical Engineering Perspectives. Distillation and Other Industrial Separations*, 239-245 [0118]
- 25 • Langer et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1981, vol. 15, 167-277 [0128]
- Langer. *Chem. Tech.*, 1982, vol. 12, 98-105 [0128]
- Sidman et al. *Biopolymers*, 1983, vol. 22, 547-556 [0128]
- Chemotherapy Service. *Williams & Wilkins*, 1992 [0133]
- Hymowitz et al. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, 633-640 [0157]
- 30 • *Disulfide Bonds in Protein Folding and Stability*. N. Derby ; T. Creighton. *Methods in Enzymology*. Humana Press Inc, 1995, vol. 40 [0157]
- Ashkenazi et al. *Safety and Antitumor Activity of Recombinant Soluble Apo2 ligand*. *JCI*, 1999, vol. 104, 155-162 [0159]
- *Solubility Diagram Analysis and the Relative Effectiveness of Different Ions on Protein Crystallization*. A. Ducruix ; MM Reis-Kautt. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology*. 1990, vol. 1, 25-30 [0166]
- 35