



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611368-0 A2**

(22) Data de Depósito: 10/05/2006
(43) Data da Publicação: 31/08/2010
(RPI 2069)



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

(54) Título: **FORMULAÇÕES DO LIGANTE APO-2/TRAIL**

(57) Resumo: FORMULAÇÕES DO LIGANTE APO-2/TRAIL.A presente invenção refere-se geralmente à purificação de Apo2L/TRAIL, envolvendo cristalização.

(30) Prioridade Unionista: 24/05/2005 US 11/136,842

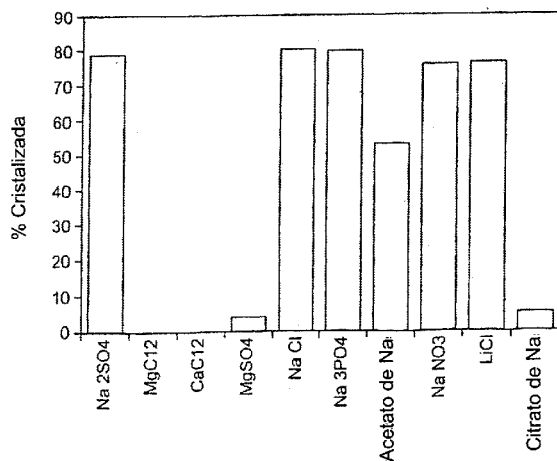
(73) Titular(es): GENENTECH, INC.,

(72) Inventor(es): HEATHER FLORES, ROGER PAI, TANYA P. LIN, TIMOTHY C. MATTHEWS, ZAHRA SHAHROKH

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006018137 de 10/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/127284 de 30/11/2006



Pat 020080010357
2; 0611368-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**FORMULAÇÕES DO LIGANTE APO-2/TRAIL**".

Campo Técnico da Invenção

A presente invenção refere-se geralmente à purificação de Apo2L/TRAIL, que envolve cristalização.

Antecedentes da Invenção

Várias moléculas, tais como o fator alfa de necrose tumoral ("TNF-alfa"), o fator beta de necrose tumoral ("TNF-beta" ou "linfotoxina-alfa") linfotoxina-beta ("LT-beta"), ligante CD30, ligante CD27, ligante CD40, ligante OX-40, ligante 4-1BB, ligante Apo-1 (também referido como ligante FAS ou ligante CD95), ligante Apo-2 (também referido como Apo-2L ou TRAIL, ligante Apo-3 (também referido como TWEAK), APRIL, ligante OPG (também referido como ligante RANK, ODF ou TRANCE), e TALL-1 (também referido como BlyS, BAFF, ou THANK) foram identificadas como membros da família de fatores de necrose tumoral ("TNF") de citocinas (vide, por exemplo, Gruss e Dower, *Blood* 85:3378-3404 (1995); Schmid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1881 (1986); Dealtry *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17:689 (1987); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, *Immunity* 3:673-682 (1995); Browning *et al.*, *Cell* 72:847-856 (1993); Armitage *et al.*, *Nature* 357:80-82 (1992); documento nº WO 97/01633, publicado em 16 de janeiro de 1997; documento nº WO 97/25428, publicado em 17 de julho de 1997; Marsters *et al.*, *Curr. Biol.* 8:525-528 (1998); Chicheportiche *et al.*, *Biol. Chem.* 272:32401-32410 (1997); Hahne *et al.*, *J. Exp. Med.* 188:1185-1190 (1998); documento nº WO 98/28426, publicado em 2 de julho de 1998; documento nº WO 98/46751, publicado em 22 de outubro de 1998; documento nº WO 98/18921, publicado em 7 de maio de 1998; Moore *et al.*, *Science* 285:260-263 (1999); Shu *et al.*, *J. Leukocyte Biol.* 65:680 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.* 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:15978-15981 (1999)). Dentre estas moléculas, TNF-alfa, TNF-beta, ligante CD30, Ligante 4-1BB, ligante Apo-1, ligante Apo-2 (Apo2L/TRAIL) e ligante Apo-3 (TEAK) foram relatados como estando envolvidas na morte celular apoptótica.

Apo2L/TRAIL foi identificado há vários anos como um membro da família dos TNFs de citocinas (vide, por exemplo, Wiley *et al.*, *Immunity* 3:673-682 (1995); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:12687-12690 (1996)). O polipeptídeo Apo2L/TRAIL humano de comprimento inteiro é uma proteína transmembrana Tipo II que tem um comprimento de 281 aminoácidos. Algumas células podem produzir uma forma solúvel natural do polipeptídeo, através da clivagem enzimática da região extracelular do polipeptídeo (Mariani *et al.*, *J. Cell Biol.* 137:221-229 (1997)). Estudos cristalográficos de formas solúveis de Apo2L/TRAIL revelam uma estrutura homotrimérica similar às estruturas de TNF e outras proteínas correlatas (Hymowitz *et al.*, *Molec. Cell* 4:563-571 (1999); Hymowitz *et al.*, *Biochemistry* 39:633:644 (2000)). Apo2L/TRAIL, diferentemente de outros membros da família de TNFs, entretanto, demonstrou ter uma característica estrutural singular pelo fato de que três resíduos de cisteína (na posição 230 de cada subunidade no homotrímero), em conjunto, coordenam um átomo de zinco, e que a ligação de zinco é importante para a estabilidade do trímero e para a atividade biológica (Hymowitz *et al.*, *supra*; Bodmer *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275:20632-20637 (2000)).

Foi relatado na literatura que Apo2L/TRAIL pode desempenhar um papel na modulação do sistema imunológico, incluindo doenças autoimunes, tais como artrite reumatóide, e no tratamento de HIV (vide, por exemplo, Thomas *et al.*, *J. Immunol.* 161:2195-2200 (1998); Johnsen *et al.*, *Cytokine* 11:664-672 (1999); Griffith *et al.*, *J. Exp. Med.* 189:1343-1353 (1999); Song *et al.*, *J. Exp. Med.* 191:1095-1103 (2000); Jeremias *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 28:143-152 (1998); Katsikis *et al.*, *J. Exp. Med.* 186:1365-1372 (1997); Miura *et al.*, *J. Exp. Med.* 193:651-660 (2001)).

As formas solúveis de Apo2L/TRAIL foram relatadas também como indutoras da apoptose em uma série de células cancerosas *in vitro*, incluindo tumores no cólon, pulmão, mama, próstata, bexiga, rim, ovário e cérebro, bem como melanoma, leucemia e mieloma múltiplo (vide, por exemplo, Wiley *et al.*, *supra*; Pitti *et al.*, *supra*; Rieger *et al.*, *FEBS Lett.* 427:124-128 (1998); Ashkenazi *et al.*, *J. Clin. Invest.* 104:155-162 (1999); Walczak *et al.*, *Nature Med.* 5:157-163 (1999); Keane *et al.*, *Cancer Res.*

59:734-741 (1999); Mizutani *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 5:2605-2612 (1999); Gazitt, *Leukemia* 13:1817-1824 (1999); Yu *et al.*, *Cancer Res.* 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:1754-1759 (2000)). Estudos *in vivo* em modelos de tumores murinos sugerem ainda que Apo2/TRAIL, isoladamente ou em combinação com quimioterapia ou terapia de radiação, pode exercer substanciais efeitos antitumorais (vide Ashkenazi *et al.*, *supra*; Walczak *et al.*, *supra*; Gliniak *et al.*, *Cancer Res.* 59:6153-6158 (1999); Chinnaiyan *et al.*, *supra*; Roth *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 265:1999 (1999)). Em contraste com muitos tipos de células cancerosas, a maioria dos tipos de células normais parecem ser resistentes à indução de apoptose por certas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi *et al.*, *supra*; Walczak *et al.*, *supra*). Jo *et al.*, relataram que uma forma solúvel de Apo2L/TRAIL marcada com poliistidina induziu apoptose *in vitro* em hepatócitos humanos isolados normais, porém não em não-humanos (Jo *et al.*, *Nature Med.* 6:564-567 (2000); vide também Nagata, *Nature Med.* 6:502-503 (2000)). Acredita-se que certas preparações de Apo2/TRAIL recombinante podem variar em termos de propriedades bioquímicas e atividades biológicas sobre células doentes versus normais, dependendo, por exemplo, da presença ou ausência de uma molécula marcadora, teor de zinco, e teor percentual de trímero (vide Lawrence *et al.*, *Nature Med. Lett. to the Editor* 7:383-385 (2001); Qin *et al.*, *Nature Med. Lett. to the Editor* 7:385-386 (2001)).

Acredita-se que a indução de várias respostas celulares mediadas por essas citocinas da família de TNFs seja iniciada por sua ligação a receptores de células específicos. Anteriormente, dois receptores de TNF distintos de aproximadamente 55 kDa (TNFR1) e 75 kDa (TNFR2) foram identificados (Hohman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264:14927-14934 (1989); Brocchhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3127-3131 (1990); documento nº EP 417.563, publicado em 20 de março de 1991; Loetscher *et al.*, 61:351 (1990); Schall *et al.*, *Cell* 61:361 (1990); Smith *et al.*, *Science* 248:1019-1023 (1990); Lewis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2830-2834 (1991); Goodwin *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 11:3020-3026 (1991)). Esses TNFRs demonstraram

compartilhar a estrutura típica de receptores da superfície celular, incluindo as regiões transmembrana extracelular e intracelular. As partes extracelulares de ambos receptores demonstraram ser também naturalmente proteínas de ligação a TNF (Nophar, Y. *et al.*, *Embo J.* 9:3269 (1990); Kohno, T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8331 (1990); Hale *et al.*, *J. Cell Biochem. Supplement 15F*, 1991, página 113 (P24)).

A parte extracelular dos TNFRs tipo 1 e tipo 2 (TNFR1 e TNFR2) contém um padrão de seqüências de aminoácidos repetido de quatro domínio ricos em cisteína (CRDs) designados 1 a 4, partindo do terminal NH₂ (S-chall *et al.*, *supra*; Loetscher *et al.*, *supra*; Smith *et al.*, *supra*; Nophar *et al.*, *supra*; Kohno *et al.*, *supra*; Banner *et al.*, *Cell* 73:431-435 (1993)). Existe um padrão repetitivo similar de CRDs em várias outras proteínas da superfície celular, incluindo o receptor do fator do crescimento nervoso p75 (NGFR) (Johnson *et al.*, *Cell* 47:545 (1986); Radeke *et al.*, *Nature* 325:593 (1987)), o antígeno de células B CD40 (Stamenkovic *et al.*, *EMBO J.* 8:1403 (1989)), o antígeno de células T OX40 (Mallet *et al.*, *EMBO J.* 9:1063 (1990)), e o antígeno Fas (Yonehara *et al.*, *supra*; e Itoh *et al.*, *Cell* 66:233-243 (1991)). As CDRs são encontradas também nas proteínas T2 semelhantes a TNFR solúvel (sTNFR) dos poxvírus de Shope e mixoma (Upton *et al.*, *Virology* 160:20-29 (1987); Smith *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:335 (1991); Upton *et al.*, *Virology* 184:370 (1991)). O alinhamento ótimo destas seqüências indica que as posições dos resíduos de cisteína são bem conservadas. Estes receptores são algumas vezes referidos como membros da superfamília de receptores de TNF/NGF.

Os ligantes da família de TNF identificados até agora, com a exceção da linfotóxina-beta, são tipicamente proteínas transmembrana do tipo II, cujo terminal C é extracelular. Em contraste, a maioria dos receptores na família de receptores de TNF (TNFR) identificada até agora são tipicamente proteínas transmembrana do tipo I. Em ambas famílias de ligantes e receptores de TNF, entretanto, a homologia identificada entre membros das famílias foi encontrada principalmente no domínio extracelular ("ECD"). Várias das citocinas da família de TNF, incluindo TNF-alfa, ligante Apo-1 e ligante

CD40, são clivadas de forma proteolítica na superfície celular; a proteína resultante em cada caso forma tipicamente uma molécula homotrimérica que funciona como uma citocina solúvel. As proteínas das famílias de receptores de TNF também são usualmente clivadas de forma proteolítica para liberar domínios extracelulares (ECDs) de receptores solúveis que podem funcionar com inibidores das citocinas cognatas.

Pan *et al.* descreveram outro membro das famílias de receptores de TNF referido como "DR4" (Pan *et al.*, *Science* 276:111-113 (1997); vide também documento nº WO 98/32856, publicado em 30 de julho de 1998)). DR4 foi relatado como contendo um domínio de morte citoplasmática capaz de engatar no aparelho de suicídio de células. Pan *et al.* descrevem que DR4 supostamente é um receptor do ligante conhecido como Apo2L/TRAIL.

Em Sheridan *et al.*, *Science* 277:818-821 (1997) e Pan *et al.*, *Science* 277:815-818 (1997), está descrita outra molécula que supostamente é um receptor para Apo2L/TRAIL (vide também documentos nºs WO 98/51793, publicado em 19 de novembro de 1998, e WO 98/41629, publicado em 24 de setembro de 1998). Esta molécula é referido como DR5 (ela foi também referida alternativamente como Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 ou KILLER (Screaton *et al.*, *Curr. Biol.* 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, *EMBO J.* 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, *Nature Genetics* 17:141-143 (1997); documentos nºs WO 98/35986, publicado em 20 de agosto de 1998; EP 870.827, publicado em 14 de outubro de 1998; WO 98/46643, publicado em 22 de outubro de 1998; WO 99/02653, publicado em 21 de janeiro de 1999; WO 99/09165, publicado em 25 de fevereiro de 1999; WO 99/11791, publicado em 11 de março de 1999). Similarmente a DR4, relata-se que DR5 contém um domínio de morte citoplasmática e é capaz de sinalizar a apoptose. A estrutura cristalina do complexo formado entre Apo2L/TRAIL e DR5 está descrita em Hymovitz *et al.*, *Molecular Cell* 4:563-571 (1999).

Um outro grupo de receptores recém-identificados é referido como "receptores-chamarizes" que supostamente funcionam como inibidores ao invés de transdutores de sinalização. Este grupo inclui DCR1 (referido

também como TRID, LIT ou TRAIL-R3) (Pan *et al.*, *Science* 276:111-113 (1999); Sheridan *et al.*, *Science* 277:818-821 (1997); McFarlane *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:25417-25420 (1997); Schneider *et al.*, *FEBS Letters* 416:329-334 (1999); Degli-Esposti *et al.*, *J. Exp. Med.* 186:1165-1170 (1997); e
 5 Mongkolsapaya *et al.*, *J. Immunol.* 160:3-6 (1998)); e DCR2 (denominado também TRUNDD ou TRAIL-R4) (Marsters *et al.*, *Current Biol.* 7:1003-1006 (1997); Pan *et al.*, *FEBS Letters* 424:41-45 (1998); Degli-Esposti *et al.*, *Im-*
 10 *munity* 7:813-820 (1997)), sendo ambas moléculas da superfície celular, bem como OPG (Simonet *et al.*, *supra*; Emery *et al.*, *infra*) e DCR3 (Pitti *et al.*, *Nature* 396:699-703 (1998)), sendo que ambas são proteínas solúveis secretadas. Relatou-se que Apo2L/TRAIL se liga a receptores referidos como DcR1, DcR2 e OPG.

Acredita-se que Apo2L/TRAIL atue através dos "receptores de morte" da superfície celular, DR4 e DR5, para ativar caspases, ou enzimas
 15 que conduzem o programa de morte celular. Depois da ligação do ligante, DR4 e DR5 conseguem disparar a apoptose independentemente recrutando e ativando o iniciador da apoptose, caspase-8, através da molécula adaptadora que contém o domínio da morte, referida como FADD/Mort1 (Kischkel
 20 *et al.*, *Immunity* 12:611-620 (2000); Sprick *et al.*, *Immunity* 12:599-609 (2000); Bodmer *et al.*, *Nature Cell Biol.* 2:241-243 (2000)). Em contraste com DR4 e DR5, os receptores DcR1 e DcR2 não sinalizam a apoptose.

Para obter uma revisão sobre a família TNF de citocinas e seus receptores, vide Ashkenazi e Dixit, *Science* 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi e Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:255-260 (2000); Glostein, *Curr. Biol.*
 25 7:750-753 (1997); Gruss e Dower, *supra*; Nagata, *Cell* 88:355-365 (1997); e Locksley *et al.*, *Cell* 104:487-501 (2001).

Sumário da Invenção

Certas proteínas, tais como Apo2L/TRAIL, e outros membros da família TNF de citocinas, apresentam atividade biológica quando a proteína
 30 é um trímero ou está na forma trimérica. Assim sendo, com os propósitos de uso terapêutico ou mesmo diagnóstico, são desejada formulações dessas proteínas nas quais a proteína é estável e permanece biologicamente ativa,

particularmente estável em uma forma trimérica.

A requerente descobriu surpreendentemente que a estrutura molecular singular de Apo2L/TRAIL, sob certas condições, permite que ela cristalize espontaneamente. Esta propriedade permitiu o desenvolvimento de um processo de recuperação/purificação eficiente e passível de aumento do volume de produção para Apo2L/TRAIL, que utiliza cristalização como uma etapa de purificação. Além disso, a experiência obtida com Apo2L/TRAIL permitiu o desenvolvimento de um processo de recuperação e purificação, que envolve cristalização, e que pode ser usado para proteínas capazes de cristalização em geral.

Em um aspecto, a presente invenção refere-se a um método para recuperar Apo2L/TRAIL a partir de uma mistura que compreende

- (a) carregar a mistura em uma coluna de troca catiônica;
- (b) lavar a coluna de troca catiônica com um tampão de equilíbrio, com o que os componentes não-ligantes presentes na mistura são removidos;
- (c) eluir Apo2L/TRAIL ligado à coluna de troca catiônica com um tampão de eluição;
- (d) resfriar gradualmente o eluído até uma temperatura de cerca de 2 e 4°C, com o que Apo2L/TRAIL é precipitada espontaneamente em uma forma cristalina, para produzir uma mistura de licor-mãe e cristais de Apo2L/TRAIL; e
- (e) recuperar Apo2L/TRAIL a partir da mistura da etapa (d) com uma pureza de pelo menos cerca de 99%.

Em uma modalidade específica, a mistura carregada na coluna de troca catiônica é um meio de cultura ou lisado celular de células produtoras de Apo2L/TRAIL.

Em outra modalidade, a mistura é o lisado celular de células hospedeiras de *E. coli* produtoras de Apo2L/TRAIL.

Em ainda outra modalidade, o lisado é clarificado antes de carregar na coluna de troca catiônica.

Em outra modalidade, o eluído obtido na etapa (c) é submetido à

etapa de cristalização (d) sem purificação adicional.

A coluna de troca catiônica pode ser, por exemplo, uma coluna SP-Sepharose.

5 Em ainda outra modalidade, o pH da mistura carregada na coluna de troca catiônica (por exemplo, SP-Sepharose) é ou é ajustado para cerca de 7,5. A eluição de Apo2L/TRAIL pode ser realizada, por exemplo, em um tampão de eluição que compreende NaCl 100-200 mM ou Na₂SO₄ 100-150 mM, em um tampão que ajusta o pH para 7,5-7,8.

10 Em outras modalidades, na etapa (d), o eluído é resfriado de uma temperatura de cerca de 15 a 30°C para uma temperatura de cerca de 2 a 8°C em cerca de uma a 60 horas, ou até uma temperatura de cerca de 2 a 8°C em cerca de uma a 8 horas, ou até uma temperatura de cerca de 2 a 8°C em cerca de uma hora, ou até uma temperatura de cerca de 4°C em cerca de uma hora.

15 Em ainda outra modalidade, o pH do eluído é ou é ajustado para pH 7,0-8,0, tal como pH 7,3, antes da cristalização.

Em outra modalidade, o pH do eluído é ou é ajustado para pH 7,5-8,0, depois da cristalização.

20 Em uma modalidade adicional, na etapa (d), a temperatura de cerca de 2 a 4°C é mantida até que seja atingida ou quase atingida a solubilidade em equilíbrio de Apo2L/TRAIL.

25 No curso da realização do método da invenção, na etapa (d), a solubilidade de Apo2L/TRAIL pode ser diminuída pela adição de um anti-solvente, tal como, por exemplo, polietilenoglicol (PEG), MPD, etanol, isopropanol e/ou dioxano.

Assim sendo, por exemplo, PEG com um peso molecular entre cerca de 400 e cerca de 10.000 dáltons é usado como um anti-solvente. Em outras modalidades representativas, o peso molecular do PEG é 400, 3.350 ou 10.000 dáltons.

30 Em outra modalidade, na etapa (e), Apo2L/TRAIL é recuperado na forma de cristais separados do licor-mãe por filtração ou centrifugação ou uma combinações destes procedimentos. O pH do licor-mãe pode ser ajus-

tado para cerca de 8,0 antes da filtração para diminuir a solubilidade.

Em outro aspecto, o método de recuperação/purificação da presente invenção compreende ainda as etapas de dissolver os cristais de Apo2L/TRAIL obtidos na etapa (d) do método descrito acima, e submeter a
5 solução obtida a uma segunda etapa de purificação cromatográfica.

Em uma modalidade, a segunda etapa de purificação cromatográfica é cromatografia por interação hidrofóbica, que pode ser realizada, por exemplo, em uma coluna Phenyl-Sepharose.

Em outra modalidade, a segunda etapa de purificação cromatográfica é uma cromatografia de troca iônica realizada, por exemplo, em uma
10 coluna CM-Sepharose ou SP-Sepharose.

Em outra modalidade, Apo2L/TRAIL é recuperado e formulado depois da segunda etapa de purificação cromatográfica por ultrafiltração-diafiltração

Em modalidades adicionais, a pureza da proteína purificada é de
15 pelo menos cerca de 99,5% ou pelo menos 99,9%.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 ilustra a seqüência de nucleotídeos do DNAc de Apo2L/TRAIL humano (SEQ ID Nº: 2) e sua seqüência de aminoácidos derivada (SEQ ID Nº: 1). O "N" na posição do nucleotídeo 447 (em SEQ ID NO
20 2) é usado para indicar que a base de nucleotídeos pode ser um "T" ou "G".

A Figura 2 ilustra um gel de coloração prata de SDS-PAGE, ilustrando a pureza das preparações de Apo2L/TRAIL descritas.

A Figura 3 ilustra os efeitos de vários sais sobre a cristalização
25 de Apo2L/TRAIL.

A Figura 4 ilustra as distribuições dos tamanhos dos cristais em equilíbrio para rampas de temperatura entre 22°C e 2°C durante períodos de resfriamento de 1, 4, 8 e 24 horas.

A Figura 5 ilustra o efeito da adição de PEG sobre a solubilidade
30 de Apo2L/TRAIL: 5 dias de agitação a 2-8°C.

Descrição Detalhada da Invenção

A. Definições

O termo “membro da família de TNF” é utilizado em um sentido amplo para se referir a vários polipeptídeos que compartilham alguma similaridade com o fator de necrose tumoral (TNF), com relação à estrutura ou função. Certas características estruturais e funcionais associadas com a família TNF de polipeptídeos são conhecidas nessas técnicas e estão descritas, por exemplo, na seção “Antecedentes da Invenção” acima. Tais polipeptídeos incluem, porém sem limitações, aqueles polipeptídeos referidos nessas técnicas como TNF-alfa, TNF-beta, ligante CD30, ligante CD27, ligante CD40, ligante OX-40, ligante 4-1BB, ligante Apo-1 (também referido como ligante Fas ou ligante CD95), ligante Apo-2 (também referido como Apo-2L/TRAIL (ou referido também como TRAIL), ligante Apo-3 (também referido como TWEAK), APRIL, ligante OPG (também referido como ligante RANK, ODF ou TRANCE), e TALL-1 (também referido como BlyS, BAFF, ou THANK) (vide, por exemplo, Gruss e Dower, *Blood* 85:3378-3404 (1995); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, *Immunity* 3:673-682 (1995); Browning *et al.*, *Cell* 72:847-856 (1993); Armitage *et al.*, *Nature* 357:80-82 (1992); publicações PCT n^{os} WO 97/01633 e WO 97/25428; Marsters *et al.*, *Curr. Biol.* 8:525-528 (1998); Chicheportiche *et al.*, *Biol. Chem.* 272:32401-32410 (1997); Hahne *et al.*, *J. Exp. Med.* 188:1185-1190 (1998); publicações PCT n^{os} WO 98/28426, WO 98/46751, e WO 98/18921; Moore *et al.*, *Science* 285:260-263 (1999); Shu *et al.*, *J. Leukocyte Biol.* 65:680 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.* 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:15978-15981 (1999)).

Os termos “Apo2L/TRAIL”, “Apo2L”, “ligante Apo-2”, e “TRAIL” são aqui utilizados para se referir a uma seqüência de polipeptídeo que inclui os resíduos de aminoácidos 114-281, inclusive, 95-281, inclusive, os resíduos 91-281, inclusive, os resíduo 41-281, inclusive, os resíduos 15-281, inclusive, ou os resíduos 1-281, inclusive, da seqüência de aminoácidos ilustrada na Figura 1 (SEQ ID N^o: 1), bem como os fragmentos biologicamente ativos, variantes conseqüentes de deleções, inserções ou substituições das

seqüências acima. Em uma modalidade, a seqüência do polipeptídeo compreende os resíduos 114-281 da Figura 1 (SEQ ID Nº: 1), e opcionalmente, consiste nos resíduos 114-281 da Figura 1 (SEQ ID Nº: 1). Opcionalmente, a seqüência do polipeptídeo compreende os resíduos 92-281 ou os resíduos 91-281 da Figura 1 (SEQ ID Nº: 1). Os polipeptídeos Apo-2L podem ser codificados pela seqüência de nucleotídeos nativa ilustrada na Figura 1 (SEQ ID Nº: 2). Opcionalmente, o códon que codifica o resíduo Pro119 (Figura 1; SEQ ID Nº: 2) pode ser "CCT" ou "CCG". Em outras modalidades, os fragmentos ou variantes são biologicamente ativos e têm pelo menos 80% de identidade da seqüência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos 90% de identidade de seqüência, e ainda mais preferivelmente, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência com qualquer uma das seqüências de Apo2L/TRAIL enunciadas acima. Opcionalmente, o polipeptídeo Apo2L/TRAIL é codificado por uma seqüência de nucleotídeos que hibridiza sob condições severas com a seqüência codificadora do polipeptídeo fornecida na Figura 1 (SEQ ID Nº: 2). A definição engloba variantes conseqüentes de substituições de Apo2L/TRAIL, nas quais pelo menos um dos seus aminoácidos nativos é substituído por um resíduo de alanina. As variantes conseqüentes de substituições específicas de Apo2L/TRAIL incluem aquelas nas quais pelo menos um aminoácido é substituído por um resíduo de alanina. Estas variantes conseqüentes de substituições incluem aquelas identificadas, por exemplo, como "D203A", "D218A" e "D269A". Esta nomenclatura é utilizada para identificar variantes de Apo2L/TRAIT nas quais os resíduos de ácido aspártico nas posições 203, 218 e/ou 269 (usando a numeração indicada na Figura 1 (SEQ ID Nº: 1)) são substituídos por resíduos de alanina. Opcionalmente, as variantes de Apo2L/TRAIT podem compreender uma ou mais das substituições de alanina que estão enunciadas na Tabela I do pedido de patente PCT publicado nº WO 01/00832. As variantes conseqüentes de substituições incluem uma ou mais das substituições de resíduos identificadas na Tabela I do pedido de patente PCT publicado nº WO 01/00832, publicado em 4 de janeiro de 2001. A definição engloba também uma seqüência nativa de Apo2L/TRIAL isolada a partir de

uma fonte de Apo2L/TRAIL ou preparada por métodos recombinantes ou sintéticos. O Apo2L/TRAIL da invenção inclui os polipeptídeos referidos como Apo2L/TRAIL ou TRAIL descritos nas publicações PCT n^{os} WO 97/01633 e WO 97/25428. Os termos "Apo2L/TRAIL" ou "Apo2L" são usados para se referir geralmente às formas de Apo2L/TRAIL que incluem as formas monoméricas, diméricas ou triméricas do polipeptídeo. Toda numeração de resíduos de aminoácidos referida na seqüência de Apo2L usa a numeração de acordo com a Figura 1 (SEQ ID N^o: 1), a menos que especificamente indicado de outra forma. Por exemplo, "D203" ou "Asp203" refere-se ao resíduo de ácido aspártico na posição 203 da seqüência fornecida na Figura 1 (SEQ ID N^o: 1).

O termo "domínio extracelular de Apo2L/TRAIL" ou "ECD de Apo2L/TRAIL" refere-se a uma forma de Apo2L/TRAIL que é essencialmente isenta de domínios transmembrana e citoplasmáticos. Normalmente, o domínio extracelular (ECD) deve ter menos do que 1% desses domínios transmembrana e citoplasmáticos, e de preferência, deve ter menos do que 0,5% desses domínios. Deve-se entender que qualquer domínio transmembrana identificado para os polipeptídeos da presente invenção são identificados segundo critérios empregados rotineiramente as técnicas para identificar esse tipo de domínio hidrofóbico. Os limites exatos de um domínio transmembrana podem variar, porém mais possivelmente em não mais do que cerca de 5 aminoácidos em cada extremidade do domínio como identificado inicialmente. Em modalidades preferidas, o ECD deve consistir em uma seqüência do domínio extracelular solúvel do polipeptídeo, que é isenta dos domínios intracelulares transmembrana e citoplasmáticos (e não é ligado à membrana). As seqüências dos domínios extracelulares específicas de Apo2L/TRAIL estão descritas nas publicações PCT n^{os} WO 97/01633 e WO 97/25428.

O termo "monômero de Apo2L/TRAIL" ou "monômero de Apo2L" refere-se a uma cadeia covalente de uma seqüência de domínio extracelular de Apo2L.

O termo "dímero de Apo2L/TRAIL" ou "dímero de Apo2L" refere-

se a dois monômeros de Apo2L unidos em uma ligação covalente por intermédio de uma ligação dissulfeto. O termo, como aqui utilizado, inclui dímeros de Apo2L autônomos e dímeros de Apo2L que estão dentro de formas triméricas de Apo2L (isto é, associados com outro, um terceiro, monômero de Apo2L).

O termo "trímero de Apo2L/TRAIL" ou "trímero de Apo2L" refere-se a três monômeros de Apo2L que estão associados de forma não-covalente.

O termo "agregado de Apo2L/TRAIL" é utilizado para se referir a formas oligoméricas superiores auto-associadas de Apo2L/TRAIL, tais como trímeros de Apo2L/TRAIL que formam, por exemplo, formas hexaméricas e nanoméricas de Apo2L/TRAIL.

A determinação da presença e da quantidade de monômero, dímero ou trímero (ou outros agregados) de Apo2L/TRAIL pode ser feita usando métodos e ensaios conhecidos nessas técnicas (e usando materiais disponíveis no mercado), tais como HPLC por exclusão de tamanho nativo("SEC"), exclusão de tamanho desnaturador, usando dodecil-sulfato de sódio ("SDS-SEC"), HPLC em fase reversa, eletroforese capilar, e incluindo os métodos descritos mais detalhadamente nos exemplos abaixo.

O termo "marcado", quando aqui utilizado, refere-se a um polipeptídeo quimérico que compreende Apo2L/TRAIL ou uma parte dele, fundido a um "polipeptídeo-marcador". O polipeptídeo-marcador tem resíduos suficientes para proporcionar um epítipo contra o qual um anticorpo pode ser produzido ou para proporcionar alguma outra função, tal como quelação de íons metálicos, mas ainda assim é curto o suficiente de tal modo que ele geralmente não interfira com a atividade da citocina da família do TNF. O polipeptídeo marcador, de preferência, é também razoavelmente singular, de tal modo que um anticorpo específico do marcador não sofra substancialmente reações cruzadas com outros epítipos. Os polipeptídeos marcadores apropriados têm geralmente pelo menos seis resíduos de aminoácidos e usualmente entre cerca de 8 e cerca de 50 resíduos de aminoácidos (de preferência, entre cerca de 10 e cerca de 20 resíduos).

O termo "íon de metal bivalente" refere-se a um metal que tem duas cargas positivas. Os exemplos de íons de metais bivalentes incluem, porém sem limitações, zinco, cobalto, níquel, cádmio, magnésio e manganês. As formas específicas desses metais, que podem ser empregadas, incluem as formas de sais (por exemplo, formas de sais farmacologicamente aceitáveis), tais como as formas de cloreto, acetato, carbonato, citrato e sulfato dos íons de metais bivalentes mencionados. Opcionalmente, um íon de metal bivalente para uso na presente invenção é zinco, e de preferência, a forma de sal sulfato de zinco ou cloreto de zinco.

O termo "isolado", quando usado para descrever as várias proteínas aqui descritas, significa uma proteína que foi identificada e separada e/ou recuperada a partir de um componente seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que tipicamente interfeririam com usos diagnósticos ou terapêuticos da proteína, e podem incluir enzimas, hormônios, e outros solutos proteínicos ou não-proteínicos. Em modalidades preferidas, a proteína deve ser purificada (1) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos do terminal N ou uma seqüência de aminoácidos internos pelo uso de um seqüenciador de copo centrifugante, ou (2) até a homogeneidade por SDS-PAGE sob condições não-redutoras ou redutoras, usando coloração com azul de Coomassie, ou, de preferência, prata, ou (3) até a homogeneidade por técnicas espectroscópicas de massas para mapeamento de peptídeos. A proteína isolada inclui proteína *in situ* dentro de células recombinantes, pois pelo menos um componente do ambiente natural de Apo2L/TRAIL não estará presente. Normalmente, entretanto, a proteína isolada deve ser preparada por pelo menos uma etapa de purificação.

Uma molécula de ácido nucléico de Apo2L/TRAIL "isolada" é uma molécula de ácido nucléico que é identificada e separada a partir de pelo menos uma molécula de ácido nucléico contaminante com a qual ela está normalmente associada na fonte natural do ácido nucléico de Apo2L/TRAIL. Uma molécula de ácido nucléico de Apo2L/TRAIL isolada é diferente na forma ou ambiente no qual ela é encontrada na natureza. As

moléculas de ácidos nucleicos de Apo2L/TRAIL isoladas são, portanto, distinguidas da molécula de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL como ela existe em células naturais. Entretanto, uma molécula de ácido nucleico de Apo2L/TRAIL isolada inclui moléculas de ácidos nucleicos de Apo2L/TRAIL contidas em células que normalmente expressam Apo2L/TRAIL, onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está em um local cromossômico diferente daquele de células naturais.

O termo "Porcentagem (5) de identidade de seqüências de aminoácidos", com relação às seqüências aqui identificadas, é definida como a porcentagem de resíduos de aminoácidos em uma seqüência-candidata, que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na seqüência de Apo2L/TRAIL, depois de alinhar as seqüências e introduzir lacunas, caso necessário, para atingir a máxima identidade percentual de seqüências, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de seqüências. O alinhamento com o propósito de determinar a máxima identidade percentual pode ser realizado de várias maneiras que estão dentro do conhecimento dos versados nessas técnicas que podem determinar os parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo designar os algoritmos necessários para atingir o máximo alinhamento em todas as seqüências de comprimento inteiro que estão sendo comparadas. Para os presentes propósitos, os valores da identidade percentual de aminoácidos podem ser obtidos usando o programa de computador para comparação de seqüências, ALIGN-2, que foi desenvolvido pela Genentech, Inc., e o código de fontes que foi depositado com a documentação do usuário no Copyright Office, Washington, DC, 20559, registrado sob o número TXU510087 do US Copyright Registration. O programa ALIGN-2 está disponível para o público através da Genentech, Inc., South San Francisco, CA. Todos os parâmetros da comparação de seqüências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

A "severidade" das reações de hibridização é determinada facilmente pelos versados nessas técnicas, e é geralmente um cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, temperatura de lavagem, e concen-

tração de sais. Geralmente, sondas mais longas requerem temperaturas mas altas para o anelamento apropriado, enquanto que sondas mais curtas necessitam temperaturas mais baixas. A hibridização depende geralmente da capacidade de o DNA desnaturado voltar a anelar quando filamentos complementares estão presentes em um ambiente abaixo da sua temperatura de fusão. Quanto mais alto o grau da identidade desejada entre a sonda e a seqüência hibridizável, mais alta a temperatura relativa que pode ser usada. Como resultado, segue-se que temperaturas relativas mais altas tenderiam a tornar as condições da reação mais severas, enquanto que temperaturas mais baixas menos assim. Para obter mais detalhes e explicações sobre a severidade das reações de hibridização, vide Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Interscience Publishers (1995).

As "condições de alta severidade", como aqui definidas, são identificadas por aquelas que: (1) empregam baixa intensidade iônica e alta temperatura de lavagem; cloreto de sódio 0,015 M/citrato de sódio 0,0015 M/0,1% de dodecil-sulfato de sódio a 50°C; (2) empregam, durante a hibridização, um agente desnaturador; formamida a 50% em volume com 0,1% de albumina de soro bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de poli(vinil-pirrolidona)/tampão de fosfato de sódio 50 mM em pH 6,5 com coreto de sódio 750 mM, citrato de sódio 75 mM a 42°C; ou (3) empregam formamida a 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sódio, 5 x solução de Dernhardt, DNA do esperma de salmão passado por ultra-som (50 µg/mL), 1% de SDS, e 10% de sulfato de dextrano a 42°C, com lavagens a 42°C em 0,2 SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50% a 55°C, e em seguida, uma lavagem de alta severidade que consiste em 0,1 x SSC contendo EDTA a 55°C.

As "condições moderadamente severas" podem ser identificadas como descrito por Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluem incubação de um dia para o outro a 37 °C em uma solução que compreende: formamida a 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trissódico 15 mM, fosfato de sódio 50 mM (pH 7,6), 5 x solução de Dernhardt, 10% de sulfato de dextrano, e 20

mg/mL de DNA do esperma de salmão desnaturado cisalhado, e em seguida, lavagem dos filtros em 1 x SSC a cerca de 37-50°C. Os versados nessas técnicas devem reconhecer como ajustar a temperatura, intensidade iônica, etc., conforme necessário para se adaptar a fatores tais como comprimento da sonda, e similares.

O termo "seqüências de controle" refere-se a seqüências de DNA necessárias para a expressão de uma seqüência codificadora ligada operacionalmente em um organismo hospedeiro específico. As seqüências de controle que são apropriadas para procariontes incluem, por exemplo, um promotor, opcionalmente uma seqüência operadora, e um sítio de ligação de ribossomas. As células eucarióticas reconhecidamente utilizam promotores, sinais de poliadenilação, e intensificadores.

Um ácido nucléico está ligado operacionalmente quando está colocado em uma relação funcional com outra seqüência de ácidos nucléicos. Por exemplo, o DNA para uma pré-seqüência ou líder secretória está ligado operacionalmente ao DNA para um polipeptídeo se ele está expressado como uma pré-proteína que participa na secreção do polipeptídeo; um promotor ou intensificador está ligado operacionalmente a uma seqüência codificadora se ele afeta a transcrição da seqüência; ou um sítio de ligação de ribossomas está ligado operacionalmente a uma seqüência codificadora se ele está posicionado de modo a facilitar a tradução. Geralmente, o termo "ligado operacionalmente" significa que as seqüências de DNA que estão sendo ligadas são contíguas, e, no caso de líder secretora, contíguas e em fase de leitura. Entretanto, os intensificadores não precisam ser contíguos. A ligação é realizada pela ligação em sítios de restrição convenientes. Caso tais sítios não existam, são usados adaptadores ou encadeadores de oligonucleotídeos sintéticos, de acordo com a prática convencional.

O termo "estável na estocagem" é utilizado para descrever uma formulação que tem um prazo de validade aceitável para um produto na cadeia distribuidora comercial, por exemplo, pelo menos 12 meses em uma dada temperatura, e de preferência, pelo menos 24 meses em uma dada temperatura. Opcionalmente, esta formulação estável durante a estocagem

contém não mais do que 5% de agregados, não mais do que 10% de dímeros e/ou mudanças mínimas na heterogeneidade de carga ou atividade biológica. As vias de degradação das proteínas podem envolver instabilidade química (isto é, qualquer processo que envolve modificação da proteína por formação de ligações ou clivagem, resultando em uma nova identidade química), ou instabilidade física (isto é, mudanças na estrutura de ordem superior da proteína). A instabilidade química pode resultar de, por exemplo, desamidação, racemização, hidrólise, oxidação, eliminação beta ou troca de dissulfetos. A instabilidade física pode resultar de, por exemplo, desnaturação, agregação, precipitação ou adsorção. As três vias de degradação de proteínas mais comuns são agregação, desamidação e oxidação de proteínas (Cleland *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4):307-377 (1993)).

Como aqui utilizado, o termo "solúvel" refere-se a polipeptídeos que, quando em soluções aquosas, são completamente dissolvidos, resultando em uma solução límpida a ligeiramente opalescente com nenhum particulado visível, avaliado por inspeção visual. Um outro ensaio da turbidez da solução (ou solubilidade da proteína) pode ser feito medindo as absorvâncias UV a 340 nm e 360 nm com uma célula de comprimento de trajetória de 1 cm, onde a turbidez a 20 mg/mL é menor do que 0,05 unidade de absorvância.

Um "osmólito" refere-se a um modificador de tonicidade ou ajustador osmótico que confere osmolaridade a uma solução. A osmolaridade refere-se à atividade osmótica total contribuída por íons e moléculas não-ionizadas para uma solução. Os exemplos incluem sais inorgânicos, tais como cloreto de sódio, polietilenoglicóis (PEGs), polipropilenoglicol, açúcares tais como sacarose e trealose, glicerina, aminoácidos e álcoois de açúcares tais como manitol, conhecidos nessas técnicas e que são considerados geralmente como seguros (GRAS).

Os "conservantes" podem atuar para impedir que bactérias, vírus e fungos proliferem na formulação, e antioxidantes ou outros compostos podem funcionar de várias maneiras para conservar a estabilidade da formula-

ção. Os exemplos incluem cloreto de octadecil-dimetil-benzil-amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio (uma mistura de cloretos de alquil-benzil-dimetil-amônio, na qual os grupos alquila são compostos de cadeia longa), e cloreto de benzetônio. Outros tipos de compostos incluem álcoois aromáticos tais como fenol, e álcool benzílico, alquil-parabenos tais como metil- ou propil-parabeno, e m-cresol. Opcionalmente, tal composto é fenol ou álcool benzílico. O conservante ou outro composto deve ser incluído opcionalmente em uma forma líquida ou aquosa da formulação de Apo2L/TRAIL, mas não usualmente em uma forma liofilizada da formulação.

5 Neste último caso, o conservante ou outro composto deve estar presente tipicamente na água para injeção (WFI) ou água bacteriostática para injeção (BWFI) usada para reconstituição.

Um “tensoativo” pode atuar para diminuir a turbidez ou a desnaturação de uma proteína em uma formulação. Os exemplos de tensoativos incluem tensoativos não-iônicos tais como Polissorbato, por exemplo, Polissorbatos 20, 60 ou 80, um Poloxâmero, como por exemplo, Poloxâmero 184 ou 188, polióis Pluronic, copolímeros em bloco de etileno/propileno ou outros conhecidos nessas técnicas e que são GRAS. Opcionalmente, o tensoativo é um Polissorbato ou um Poloxâmero.

15

O termo “tampão”, como aqui utilizado, é qualquer tampão apropriado que é GRAS e confere geralmente um pH entre cerca de 6 e cerca de 9, opcionalmente entre cerca de 6,5 e cerca de 8,5, e opcionalmente, cerca de 7 a cerca de 7,5, caso o polipeptídeo seja Apo2L/TRAIL. Os exemplos incluem Tris, Hepes, trietanol-amina, histidina, ou quaisquer outros conhecidos nessas técnicas como tendo o efeito desejado.

20

25

O termo “citocina” é um termo genérico para proteínas liberadas por uma população de células que atuam sobre outra célula como mediadores intercelulares. Os exemplos de tais citocinas são linfocinas, monocinas, e polipeptídeos hormonais tradicionais. Estão incluídos entre as citocinas os hormônios do crescimento tais como o hormônio do crescimento humano, o hormônio do crescimento humano N-metionila, e hormônio do crescimento bovino; hormônio paratireóide; tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina; pró-

30

relaxina; hormônios glicoprotéicos tais como hormônio flicuoestimulante (FSH), hormônio estimulante da tireóide (TSH), e hormônio luteinizante (LH); fator do crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblastos; prolactina; lactogênio placentário; fator de necrose tumoral-alfa e -beta; substância inibidora mülleriana; peptídeo associado à gonadotropina do camundongo; inhibina; activina; fator do crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores do crescimento nervoso; fator do crescimento de plaquetas; fatores de transformação do crescimento (TGFs), tais como TGF-alfa e TGF-beta; fator I e II de crescimento semelhante à insulina; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferons alfa e gama; fatores estimulantes de colônias, tais como fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF); fator estimulante de granulócitos e macrófagos (GM-CSF); e fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF); interleucinas (Ls) tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; e outros fatores polipeptídicos incluindo LIF e ligante kit (KL). Como aqui utilizado, o termo "citocina" inclui proteínas de origens naturais ou e culturas de células recombinantes e equivalentes biologicamente ativos das citocinas com seqüências nativas.

O termo "agente citotóxico", como aqui utilizado, refere-se a uma substância que inibe ou impede o funcionamento de células e/ou causa destruição de células. O termo pretende incluir isótopos radioativos (por exemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y e ^{186}Re), agentes quimioterápicos, e toxinas tais como toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos delas.

Um "agente quimioterápico" é um composto químico útil no tratamento de câncer. Os exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes tais como tiotepa e ciclofosfamida (CYTOXAN[®]); sulfonatos de alquilas tais como bussulfan, improssulfan e pipossulfan; aziridinas tais como bezodopa, meturedopa e uredopa; etilenoiminas e metil-amelaminas, incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilol-melamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos a-

dozelesina, carzelesina e bizelesina; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictiina; espongistatina; mostardas nitrogenadas tais como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosuréias tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tais como os antibióticos de enediina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama 11 e caliqueamicina phil1, vide, por exemplo, Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.* 33:183-186 (19994); dinemicina, incluindo dinemicina A; bis-fosfonatos, tal como clodronato; uma esperamicina; bem como o cromóforo neocarzinostatina e cromóforos antibióticos de enediina de cromoproteínas correlatos), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azasserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina (Adryamicin[®]) (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabólitos tais como metotrexato e 5-fluorouracila (5-FU); análogos do ácido fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterinina, trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxridina; androgênios tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositores de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracila; ansacrina; bestrabucila; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecol-

cina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; uma epotilona; etoglucid;
 nitrato de gálio; hidroxauréia; lentinan; lonidamina; maitansinóides tais como
 maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitra-
 crina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico;
 5 2-etil-hidrazida; procarbazona PSK[®]; razoxano; rizoxina; sizofirano; espiro-
 germânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2''-triclora-trietil-amina; trico-
 tecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina);
 uretan; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipo-
 bromano; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxói-
 10 des, como por exemplo, paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology,
 Princeton, NJ) e docetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony,
 França); clorambucil; gencitabina (Gemzar[®]); 6-tioguanina; mercaptopurina;
 metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblas-
 tina; platina; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinor-
 15 relbina (Navlebine[®]); novantrona; teniposida; edatrexato; daunomicina; ami-
 nopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerasas RFS
 2000; diflúor-metil-ornitina (DMFO); retinóides, tal como ácido retinóico; ca-
 pecitabina; e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de
 qualquer um dos acima. Estão incluídos também nesta definição os agentes
 20 anti-hormonais que atuam para regular ou inibir a ação hormonal sobre tu-
 mores, tais como anti-estrogênicos e moduladores de receptores seletivos de
 estrogênicos (SERMs), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo Noval-
 dex[®]), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno,
 LY117018, onapristona, e toremifeno (Fareston[®]); inibidores de aromatase
 25 que inibem a enzima aromatase, que regula a produção na glândula supra-
 renal (adrenal), tais como, por exemplo, 4(5)-imidazóis, aminoglutetimida,
 acetato de megestrol (Megace[®]), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol
 (Rivisor[®]), letrosol (Femara[®]), e anastrozol (Arimidex[®]); e anti-androgênicos
 tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserrelina; e os
 30 sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um dos
 acima.

O termo "agente inibidor de crescimento", quando aqui utilizado,

refere-se a um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula, especialmente uma célula cancerosa que expressa qualquer um dos genes aqui identificados, seja *in vitro* ou *in vivo*. Assim sendo, o agente inibidor do crescimento é um que reduz significativamente a porcentagem de células que superexpressam tais genes na fase S. Os exemplos de agentes inibidores de crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (em um ponto diferente da fase S), tais como os agentes que induzem a detenção da fase G1 e a detenção da fase M. Os bloqueadores da fase M clássicos incluem as vincas (vincristina e vinblastina), taxol, e inibidores de topo II tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposida e bleomicina. Os agentes que detêm G1 também se espriam sobre a detenção da fase S, como por exemplo, agentes alquilantes de DNA, tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracila, e ara-C. Outras informações podem ser encontradas em "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn e Israel, editores, Capítulo 1, intitulado "Cell Cycle Regulation, Oncogenes, and Antineoplastic Drugs", por Murakami *et AL.* (W.B. Saunders, Filadélfia, 1995), especialmente página 13.

O termo "biologicamente ativo" ou "atividade biológica", para os propósitos deste relatório descritivo, significa (a) ter a capacidade de induzir ou estimular a apoptose em pelo menos um tipo de célula cancerosa de mamífero ou célula infectada por vírus *in vivo* ou *ex vivo*, seja isoladamente como um único agente ou em combinação com um agente quimioterápico; (b) a capacidade de criar um anticorpo, isto é, imunogênico; (c) a capacidade de se ligar e/ou estimular um receptor para Apo2L/TRAIL (tais receptores podem incluir o receptor DR4, o receptor DR5, OPG, o receptor DcR1, e o receptor DcR2); ou (d) reter a atividade de um polipeptídeo Apo2L/TRAIL de ocorrência natural. Os ensaios para determinar a atividade biológica de Apo2L/TRAIL podem ser conduzidos usando métodos conhecidos nessas técnicas, tais como fragmentação de DNA (vide, por exemplo, Marsters *et al.*, *Biology* 6:1669 (1996), inativação de caspases, ligação de DR4, ligação de DR5 (vide, por exemplo, documento nº WO 98/51793, publicado em 19

de novembro de 1998), ligação de DcR1 (vide, por exemplo, documento nº WO 98/58062, publicado em 23 de dezembro de 1998), ligação de DcR2 (vide, por exemplo, documento nº WO 99/10484, publicado em 4 de março de 1999), bem como os ensaios descritos nas publicações PCT nºs WO 5 97/01633, WO 97/25428, WO 01/00832 e WO 01/22987.

Os termos “apoptose” e “atividade apoptótica” são utilizados em um sentido amplo e referem-se à forma ordenada ou controlada de morte celular em mamíferos, que é tipicamente acompanhada de uma ou mais mudanças de células características, incluindo condensação do citoplasma, 10 perda de microvilosidades da membrana plasmática, segmentação do núcleo, degradação do DNA cromossômico ou perda de função mitocondrial. Esta atividade pode ser determinada e medida, por exemplo, por ensaios de viabilidade celular (tais como ensaios com azul de Alamar ou ensaios com MTT), análise FACS, ativação de caspases, fragmentação de DNA (vide, por exemplo, Nicoletti *et al.*, *J. Immunol. Methods* 139:271-279 (1991), e poli- 15 ADP polimerase, “PARP”, ensaios de clivagem conhecidos nessas técnicas.

Como aqui utilizado, o termo “distúrbio” em geral refere-se a qualquer condição que se beneficiaria do tratamento com as composições aqui descritas, incluindo qualquer doença ou distúrbio que pode ser tratado 20 por quantidades eficazes de polipeptídeos, tal como Apo2L/TRAIL. Isto inclui distúrbios crônicos e agudos, bem como aquelas condições patológicas que predisõem o mamífero ao distúrbio em questão. Os exemplos não-limitativos distúrbios a serem tratados neste caso incluem cânceres benignos e malignos; distúrbios inflamatórios, angiogênicos e imunogênicos; distúrbios 25 auto-imunes, artrite (incluindo artrite reumatóide), esclerose múltipla, e HIV/AIDS.

Os termos “câncer”, “canceroso” ou “maligno” referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos, que é caracterizada tipicamente por crescimento celular desregulado. Os exemplos de cânceres incluem, porém sem limitações, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma e sarcoma. Os exemplos mais específicos de tais cânceres incluem carcinoma de 30 células escamosas, mieloma, câncer pulmonar de células pequenas, câncer

pulmonar de células não-pequenas, glioma, câncer gastrointestinal, câncer renal, câncer ovariano, câncer hepático, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, câncer colorretal, câncer endométrico, câncer renal, câncer renal, câncer prostático, câncer tireóideo, neuroblastoma, câncer pancreático, glioblastoma multiforme, câncer cervical, câncer estomacal, câncer da bexiga, hepatoma, câncer mamário, carcinoma colônico, e câncer de cabeça e pescoço. Opcionalmente, as células cancerosas expressam os receptores DR4 e/ou DR5.

Os termos “tratar”, “tratamento” e “terapia”, como aqui utilizados, referem-se à terapia curativa, terapia profilática e terapia preventiva. O tratamento ou administração consecutiva refere-se ao tratamento em uma base pelo menos diária sem interrupção no tratamento por um ou mais dias. O tratamento ou administração intermitente, ou tratamento ou administração de uma maneira intermitente, refere-se ao tratamento que não é consecutivo, e ao invés disso, de natureza cíclica.

O termo “mamífero”, como aqui utilizado, refere-se a qualquer mamífero classificado como um mamífero, incluindo seres humanos, bovídeos, eqüinos, caninos e felinos. Em uma modalidade preferida da invenção, o mamífero é um ser humano.

O termo “poliol”, quando aqui utilizado, refere-se amplamente a compostos de álcoois poli-hidroxiados. Os polióis podem ser qualquer polímero de poli(óxido de alqueno) solúvel em água, por exemplo, e podem ter uma cadeia linear ou ramificada. Os polióis preferidos incluem aqueles substituídos em uma ou mais posições de hidroxilas por um grupo químico, tal como um grupo alquila que tem entre um e quatro carbonos. Tipicamente, o poliol é um polialquilenoglicol, de preferência polietilenoglicol (PEG). Entretanto, os versados nessas técnicas devem reconhecer que outros polióis, tais como, por exemplo, polipropilenoglicol e copolímeros de polietileno/polipropileno glicol, podem ser empregados para conjugação a proteínas e outras biomoléculas. Os polióis incluem aqueles conhecidos nessas técnicas e aqueles francamente disponíveis, tais como aqueles disponíveis em fornecedores comerciais.

B. Métodos e Materiais Exemplificativos para Conduzir a Invenção

A presente invenção fornece métodos para a recuperação e purificação de Apo2L/TRAIL. Particularmente, a invenção fornece métodos que envolvem cristalização para recuperar e purificar Apo2L/TRAIL a partir de misturas nas quais ele está acompanhado de outros contaminantes, tais como proteínas contaminantes e outras impurezas. Em uma modalidade específica, a invenção fornece métodos para recuperar e purificar Apo2L/TRAIL a partir de culturas de hospedeiros ou lisados de células recombinantes de células hospedeiras recombinantes de *E coli* produtoras de Apo2L/TRAIL.

A base destes métodos de purificação é a descoberta surpreendente que Apo2L/TRAIL cristaliza fácil e espontaneamente em certos sistemas de tampões. Esta descoberta permite usar a cristalização como uma etapa eficiente da purificação no esquema de purificação de Apo2L/TRAIL. Particularmente, o trabalho experimental subjacente à presente invenção demonstrou que a cristalização pode ser implementada como uma etapa no processo de purificação de Apo2L/TRAIL e outras proteínas que apresentam uma tendência similar de cristalização espontânea. A incorporação de uma etapa de cristalização no esquema de purificação permite a redução das etapas do processo de purificação, e ao mesmo tempo, mantendo rendimentos comparáveis a esquemas de purificação tradicionais que usam múltiplas etapas cromatográficas de purificação, sem cristalização. Conseqüentemente, ao implementar a cristalização no processo de purificação pode resultar em economias de tempo e custo acentuadas, sem comprometer a eficiência, os volumes do produto ou a qualidade do produto.

B.1 Produção de Apo2L/TRAIL

A descrição abaixo refere-se a métodos para produzir Apo2L/TRAIL cultivando células hospedeiras transformadas ou transfectadas com um vetor que contém um ácido nucléico que codifica Apo2L/TRAIL e recuperar o polipeptídeo a partir da cultura de células.

O DNA que codifica Apo2L/TRAIL pode ser obtido a partir de qualquer biblioteca de DNAC preparada a partir do tecido que se acredita possuir o RNAm de Apo2L/TRAIL e expressá-lo em um nível detectável.

Conseqüentemente, o DNA de Apo2L/TRAIL humano pode ser obtido convenientemente a partir de uma biblioteca de DNAC preparada a partir de tecidos humanos, tal como uma biblioteca de bacteriófagos do DNAC placentário humano, como descrito na publicação PCT nº WO 97/25428. O gene que codifica Apo2L/TRAIL também pode ser obtido a partir de uma biblioteca genômica ou por síntese de oligonucleotídeos.

As bibliotecas podem ser triadas com sondas (tais como anticorpos para Apo2L/TRAIL ou nucleotídeos com pelo menos cerca de 20-80 bases) desenhadas para identificar o gene de interesse da proteína codificada por ele. A triagem da biblioteca de DNAC ou genômica com a sonda selecionada pode ser conduzida usando procedimentos usuais (Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Um meio alternativo para isolar o gene que codifica Apo2L/TRAIL é usar a metodologia de PCR (Sambrook *et al.*, *supra*; Diefenbach *et al.*, "PCR Primer: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

Os fragmentos ou variantes da seqüência de aminoácidos de Apo2L/TRAIL podem ser preparados introduzindo mudanças de nucleotídeos apropriadas no DNA de Apo2L/TRAIL, ou por síntese do polipeptídeo Apo2L/TRAIL desejado. Tais fragmentos ou variantes representam inserções, substituições e/ou deleções de resíduos dentro de uma ou ambas extremidades da região intracelular, da região transmembrana, ou da região extracelular, ou da seqüência de aminoácidos ilustrada para Apo2L/TRAIL de comprimento inteiro na Figura 1 (SEQ ID Nº: 1). Qualquer combinação de inserção, substituição e/ou deleção pode ser feita para chegar à construção final, desde que a construção final possua, por exemplo, uma atividade biológica ou atividade apoptótica desejada, como aqui definido. Em uma modalidade preferida, os fragmentos ou variantes têm pelo menos 80% de identidade de seqüências de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de identidade de seqüências, e ainda mais preferivelmente, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de seqüências com, por exemplo, as seqüências aqui identificadas para os domínios intracelulares,

transmembrana ou extracelulares de Apo2L/TRAIL, ou a seqüência de comprimento inteiro para Apo2L/TRAIL. As mudanças de aminoácidos podem alterar também processos pós-translacionais de Apo2L/TRAIL, tal como a mudança do número ou posição de sítios de glicosilação ou alteração das características de ancoragem da membrana.

As variações na seqüência de Apo2L/TRAIL, descritas acima, podem ser feitas usando qualquer uma das técnicas e orientações para mutações conservativas e não-conservativas enunciadas na patente nº US 5.364.934. Elas incluem mutagênese mediada por oligonucleotídeos (direcionada a sítios), varredura de alanina, e mutagênese por PCR.

A análise de aminoácidos por varredura pode ser empregada para identificar um ou mais aminoácidos ao longo de uma seqüência contígua. Dentre os aminoácidos de varredura preferidos estão aminoácidos neutros relativamente pequenos. Tais aminoácidos incluem alanina, glicina, serina e cisteína. A alanina é tipicamente um aminoácido de varredura preferido entre este grupo porque ela elimina a cadeia lateral para além do carbono beta e é menos possível que altere a conformação da cadeia lateral da variante (Conningham *et al.*, *Science* 244:1081 (1989)). A alanina é também tipicamente preferida porque ela é o aminoácido mais comum. Além disso, ela é encontrada freqüentemente em posições enterradas e expostas (Creighton, "The Proteins", W.H. Freeman & Co., NY; Clothia, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1976)).

As variantes específicas de Apo2L/TRAIL da presente invenção incluem aqueles polipeptídeos Apo2L/TRAIL que incluem uma ou mais das substituições de alanina enunciadas, indicadas na Tabela I do pedido de patente PCT publicado nº WO 01/00832. Tais variantes de Apo2L/TRAIL compreendem tipicamente uma seqüência de aminoácidos de ocorrência não-natural que difere de uma seqüência de aminoácidos nativa de Apo2L/TRAIL (tal como aquela fornecida na Figura 1; SEQ ID Nº: 1, para uma forma de comprimento inteiro ou madura de Apo2L/TRAIL ou uma seqüência do domínio extracelular) em pelo menos um ou mais aminoácidos. Opcionalmente, um ou mais aminoácidos que diferem na variante de Apo2L/TRAIL em comparação com um Apo2L/TRAIL nativo devem compreender uma ou mais

substituições de aminoácidos tais como aquelas indicadas na Tabela I do documento nº WO 01/00832. As variantes de Apo2L/TRAIL da invenção incluem variantes solúveis de Apo2L/TRAIL que compreendem os resíduos 91-281, 92-281, 95-281 ou 92-281, 95-281 ou 114-281 da Figura 2 (SEQ ID Nº: 1) e tendo uma ou mais substituições de aminoácidos que intensificam a atividade biológica, tal como a ligação ao receptor. Uma variante particularmente preferida compreende os resíduos 114-281 da Figura 1 (SEQ ID Nº: 1). Em uma modalidade específica, Apo2L/TRAIL consiste nos resíduos 114-281 da Figura 1 (SEQ ID Nº: 1).

10 Como descrito no documento nº WO 01/00832, publicado em 4 de janeiro de 2001, a estrutura dos cristais em raios X do domínio extracelular de Apo2L/TRAIL, identificada, e a mutagênese de escaneamento de alanina foi realizada para produzir o mapeamento das suas regiões de contato com receptores. A estrutura obtida para Apo2L/TRAIL revelou uma proteína
15 homotrimérica que contém um sítio de ligação de íon metálico bivalente (zinco) que coordena a interação das três subunidades da molécula trimérica de Apo2L/TRAIL. Similarmente a outros membros da família de TNF, Apo2L/TRAIL parece compreender um trímero compacto formado por três monômeros em rolo gelificado que transmitem aproximadamente 5.100
20 angstrom² (1.700 angstrom² por monômero) para formar o trímero globular. A posição dos filamentos beta do núcleo foi bem-conservada em comparação com os outros membros estruturalmente caracterizados da família de TNF, TNF-alfa, TNF-beta e CD40L, em comparação com os filamentos do núcleo de TNF-alfa ou TNF-beta.

25 As variações na seqüência de Apo2L/TRAIL incluídas também dentro do escopo da invenção referem-se a derivados ou formas modificadas do terminal amino. Tais seqüências de Apo2L/TRAIL podem incluir os polipeptídeos Apo2L/TRAIL aqui descritos, que têm uma metionina ou metionina modificada (tal como formil-metionina ou outra espécie de metionila
30 bloqueada) no terminal N da seqüência do polipeptídeo.

O ácido nucléico (por exemplo, DNAC ou DNA genômico) que codifica Apo2L/TRAIL nativo ou variante pode ser inserido em um vetor re-

plicável para clonagem adicional (ampliação do DNA) ou para expressão. Vários vetores estão disponíveis para o público. Os componentes do vetor incluem geralmente, porém sem limitações, um ou mais dos seguintes: uma seqüência de sinais, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento intensificador, um promotor, e uma seqüência da terminação da transcrição, cada um dos quais estando descrito abaixo. As seqüências de sinais, origens de replicação, genes marcadores, elementos intensificadores e seqüências terminadoras da transcrição, opcionais, que podem ser empregados, são conhecidos nessas técnicas e estão descritos mais detalhadamente na publicação PCT nº WO 97/25428.

Os vetores de expressão e clonagem contêm usualmente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está ligado operacionalmente à seqüência de ácidos nucléicos de Apo2L/TRAIL. Os promotores são seqüências não-traduzidas localizadas a montante (5') do códon de partida de um gene estrutural (geralmente dentro de cerca de 100 a 1.000 pares de bases) que controlam a transcrição e a tradução de uma seqüência de ácidos nucléicos específica, tal como a seqüência de ácidos nucléicos de Apo2L/TRAIL, à qual eles estão ligados operacionalmente. Tais promotores, tipicamente, caem dentro de duas classes, induzíveis e constitutivos. Os promotores induzíveis são promotores que iniciam maiores níveis de transcrição a partir do DNA sob seu controle em resposta a alguma mudança nas condições de cultura, como por exemplo, a presença ou ausência de um nutriente, ou uma mudança na temperatura. Atualmente, um grande número de promotores reconhecidos por uma série de células hospedeiras potenciais é bem conhecido. Estes promotores são ligados operacionalmente ao DNA que codifica Apo2L/TRAIL removendo o promotor do DNA fonte por digestão com enzima de restrição e inserindo a seqüência do promotor isolada no vetor. A seqüência do promotor de Apo2L/TRAIL nativa e muitos promotores heterólogos podem ser usados para direcionar a ampliação e/ou a expressão do DNA de Apo2L/TRAIL.

Os promotores apropriados para uso com hospedeiras procarióticas e eucarióticas são conhecidos nessas técnicas, e estão descritos mais

detalhadamente na publicação PCT nº WO 97/25428.

Os métodos preferidos para a produção de Apo2L/TRAIL solúvel em *E. coli* empregam um promotor induzível para a regulação da expressão do produto. O uso de um promotor induzível controlável permite o crescimento da cultura até a densidade celular desejável antes da indução da expressão do produto e acumulação de quantidades significativas do produto, que podem não ser bem toleradas pelo hospedeiro.

Vários sistemas de promotores induzíveis (incluindo T7 polimerase, *trp* e fosfatase alcalina (AP)) foram avaliados pela requerente para a expressão de Apo2L/TRAIL (aminoácidos 114-281). O uso de cada um entre os promotores T7 polimerase, *trp* e fosfatase alcalina resultou em quantidades significativas do trímero de Apo2L/TRAIL solúvel biologicamente ativo, recuperado a partir de uma pasta de células colhidas. Outro promotor opcional é um sistema promotor glicerina-fosfato.

A construção de vetores apropriados que contêm um ou mais dos componentes listados acima emprega técnicas de ligação usuais. Os plasmídeos ou fragmentos de DNA isolados são clivados, individualizados, e religados na forma desejada para gerar os plasmídeos requeridos.

Para a análise a fim de confirmar as seqüências corretas nos plasmídeos construídos, podem ser usadas misturas de ligação para transformar a cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446) e os transformantes exitosos são selecionados por resistência à ampicilina ou tetraciclina quando apropriado. Os plasmídeos dos transformantes são preparados, analisados por digestão com endonuclease de restrição e/ou seqüenciados usando técnicas convencionais conhecidas nessa área (vide, por exemplo, Messing *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 9:309 (1981); Maxam *et al.*, *Methods in Enzynology*, 65:499 (1980)).

Podem ser empregados vetores de expressão que proporcionam a expressão transiente em células de mamíferos do DNA que codifica Apo2L/TRAIL. Em geral, a expressão transiente envolve o uso de um vetor de expressão que é capaz de replicar eficientemente em uma célula hospedeira, de tal modo que a célula hospedeira acumule muitas cópias do vetor

de expressão e, por sua vez, sintetize altos níveis de um polipeptídeo desejado codificado pelo vetor de expressão (Sambrook *et al.*, supra). Os sistemas de expressão transiente, que compreendem um vetor de expressão apropriado e uma célula hospedeira apropriada, permitem a identificação positiva conveniente de polipeptídeos codificados por DNAs clonados, bem como a triagem rápida de tais polipeptídeos quanto às propriedades biológicas ou fisiológicas desejadas. Assim sendo, os sistemas de expressão transiente são particularmente úteis na invenção com o propósito de identificar análogos e variantes e Apo2L/TRAIL que são Apo2L/TRAIL biologicamente ativos.

Outros métodos, vetores e células hospedeiras apropriadas para adaptação para a síntese de Apo2L/TRAIL em cultura de células recombinantes de vertebrados estão descritas em Gething *et al.*, *Nature* 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature* 281:40-46 (1979); documentos nºs EP 117.060 e EP 117.058.

As células hospedeiras apropriadas para clonar ou expressar o DNA nos vetores neste caso incluem células de procariontes, leveduras, ou eucariontes superiores. Os procariontes apropriados para este propósito incluem, porém sem limitações, eubactérias, tais como organismos gram-negativos ou gram-positivos, como por exemplo, *Enterobacteriaceae* tais como *Escherichia*, por exemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por exemplo, *Salmonella Typhimurium*, *Serratia*, por exemplo, *Serratia marcescans* e *Shigella*, bem como *Bacilli* tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41P descrito no documento nº DD 266.710, publicado em 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. De preferência, a célula hospedeira deve secretar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas.

E. coli é a célula hospedeira apropriada para uso na presente invenção. *E. coli* é particularmente bem apropriada para a expressão de Apo2L/TRAIL (compreendendo os aminoácidos 114-281 da Figura 1), um polipeptídeo com um tamanho menor do que 20 kD com nenhuma necessidade de glicosilação. Com uma hospedeira produtora, *E. coli* pode ser culti-

vada até uma densidade celular relativamente alta e é capaz de produzir níveis relativamente altos de proteínas heterólogas.

Além de procariontes, micróbios eucarióticos, tais como fungos filamentosos ou leveduras são hospedeiros apropriados de clonagem ou expressão para vetores que codificam Apo2L/TRAIL. As células hospedeiras apropriadas para a expressão de Apo2L/TRAIL glicosilado são derivadas de organismos multicelulares. Os exemplos de tais células hospedeiras, incluindo células CHO, estão descritos adicionalmente na publicação PCT nº WO 97/25428.

As células hospedeiras são transfectadas, e de preferência, transformadas com os vetores de expressão ou clonagem descritos acima para a produção de Apo2L/TRAIL, e cultivadas em meios nutrientes modificados conforme apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes, ou ampliar os genes que codificam as seqüências desejadas.

O termo "transfecção" refere-se à captação de um vetor de expressão por uma célula hospedeira, estejam ou não quaisquer seqüências codificadoras de fato expressadas. Vários métodos de transfecção são conhecidos pelos versados nessas técnicas, como por exemplo, CaPO₄ e eletroporação. A transfecção exitosa é reconhecida geralmente quando qualquer indicação da operação deste vetor ocorre dentro da célula hospedeira.

O termo "transformação" significa introduzir um DNA em um organismo de tal modo que o DNA seja replicável, seja como um elemento extracromossômico ou como um integrante cromossômico. Dependendo da célula hospedeira usada, a transformação é feita usando técnicas usuais apropriadas para essas células. O tratamento com cálcio, empregando cloreto de cálcio, como descrito em Sambrook *et al.*, supra, ou eletroporação, é usado geralmente para procariontes ou outras células que contêm barreiras de paredes celulares substanciais. A infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é usada para a transformação de certas células vegetais, como descrito (Shaw *et al.*, *Gene* 23:315 (1983); e publicação PCT nº WO 89/05859). Além disso, plantas podem ser transfectadas usando tratamento com ultra-som, publicação PCT nº WO 91/00358, publicado em 10 de janeiro de 1991.

Para células de mamíferos sem tais paredes celulares, o método de precipitação com fosfato de cálcio (Graham e Van der Eb, *Virology* 52:456-457 (1978)) pode ser empregado. Os aspectos genéricos de transformações com sistemas hospedeiros de células de mamíferos foram descritos na patente nº 4.399.216. As transformações em levedura são conduzidas tipicamente de acordo com o método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.* 130:946 (1977); e Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:3829 (1979). Entretanto, outros métodos para introduzir DNA em células também podem ser usados, tais como microinjeção nuclear, eletroporação, fusão de protoplastos bacterianos com células intactas, policátions, por exemplo, polibreno, poliornitina. Para obter informações sobre várias técnicas para transformar células de mamíferos, vide Keown *et al.*, *Methods in Enzymology* 185:527-537 (1990); e Mansour *et al.*, *Nature* 336:348-352 (1988).

As células procarióticas usadas para produzir Apo2L/TRAIL podem ser cultivadas em meios de cultura apropriados, como descrito geralmente em Sambrook *et al.*, *supra*. As formas específicas de meios de cultura que podem ser empregados para cultivar *E. coli* estão descritas adicionalmente no pedido de patente PCT nº WO 01/00832. Em um processo particularmente preferido, Apo2L/TRAIL (compreendendo os aminoácidos 114-281 da Figura 1) produzido em *E. coli* é fermentado usando uma fonte de zinco e glicerofosfato. As titulações da fermentação ficam, de preferência na faixa entre cerca de 4 e cerca de 6 g/L.

As células hospedeiras de mamíferos usadas para produzir Apo2L/TRAIL podem ser cultivadas em uma série de meios de cultura.

Os exemplos de meios de cultura disponíveis no mercado incluem meio de Ham (Sigma), Meio Essencial Mínimo ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Meio de Eagle Modificado de Dulbecco ("DMEM", Sigma). Qualquer um desses meios pode ser suplementado conforme necessário com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (tais como insulina, transferrina, e fosfato), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tal como HEPES), nucleosídeos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tal como o fármaco Gentamycin[®]), micronutrientes (definidos co-

mo compostos inorgânicos usualmente presentes em concentrações finais na faixa micromolar), e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários também podem ser inclusos em concentrações apropriadas, e eles são conhecidos pelos versados nessas técnicas. As condições da cultura, tais como temperatura, pH, e similares, são aquelas usadas anteriormente com a célula hospedeira selecionada para expressão, e devem ficar evidentes para os versados nessas técnicas.

Geralmente, os princípios, protocolos e técnicas práticas para maximizar a produtividade de culturas de células de mamíferos podem ser encontradas em "Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach", M. Butler, editor (IRL Press, 1991).

A expressão de Apo2L/TRAIL pode ser medida em uma amostra diretamente, por exemplo, por *Southern blotting* convencional, *Northern blotting* convencional, para quantificar a transcrição do RNAm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5201-5205 (1980)), *dot blotting* (análise de DNA), ou hibridização *in situ*, usando uma sonda marcada adequadamente, baseado nas seqüências aqui fornecidas. Vários marcadores podem ser empregados, mais comumente radioisótopos, e particularmente ^{32}P . Entretanto, outras técnicas também podem ser empregadas, tais como usando nucleotídeos modificados com biotina para introdução em um polinucleotídeo. A biotina serve, então, como o sítio para ligação à avidina ou anticorpos, que podem ser marcados com uma ampla série de marcadores, tais como radionucleotídeos, fluorescentes ou enzimas. Alternativamente, podem ser empregados anticorpos que podem reconhecer cópias específicas, incluindo cópias de DNA, cópias de RNA, e cópias híbridas de DNA-RNA ou cópias de DNA-proteína. Os anticorpos, por sua vez, podem ser marcados e o ensaio pode ser conduzido onde o dúplex está ligado a uma superfície, de tal modo que, depois da formação do dúplex sobre a superfície, a presença de anticorpo ligado ao dúplex possa ser detectada.

A expressão de genes, alternativamente, pode ser medida por métodos imunológicos, tais como coloração imunistoquímica de células ou seções de tecido, e ensaio de cultura de células ou fluidos corporais, para

quantificar diretamente a expressão do produto gênico. Com as técnicas de coloração imunoistoquímica, uma amostra de célula é preparada, tipicamente por desidratação e fixação, e em seguida, reação com anticorpos marcados específicos para o produto gênico acoplado, onde os marcadores são
5 usualmente detectados visualmente, tais como marcadores enzimáticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminescentes, e similares.

Os anticorpos úteis para coloração imunoistoquímica e/ou ensaio de amostras de fluidos podem ser monoclonais ou policlonais, e podem ser preparados em qualquer mamífero. Convenientemente, os anticorpos
10 podem ser preparados contra um polipeptídeo Apo2L/TRAIL nativo ou contra um peptídeo sintético baseado nas seqüências de DNA aqui fornecidas ou contra uma seqüência exógena fundida ao DNA de Apo2L/TRAIL e codificando um epítipo de anticorpo específico.

O polipeptídeo Apo2L/TRAIL pode ser anexado de forma covalente (aqui doravante denominado "conjugado") a um ou mais grupos químicos.
15 Os grupos químicos apropriados para uso em um conjugado de Apo-2L são, de preferência, não significativamente tóxicos ou imunogênicos. Vários grupos químicos exemplificativos, que podem ser conjugados a polipeptídeos, são conhecidos nessas técnicas e incluem, por exemplo, carboidratos,
20 tais com aqueles carboidratos que ocorrem naturalmente em glicoproteínas, poliglutamato, e polímeros não-proteináceos, tais como polióis (vide, por exemplo, patente nº US 6.245.901.

Um polioliol, por exemplo, pode ser conjugado aos polipeptídeos, tal como Apo-2L, em um ou mais resíduos de aminoácidos, incluindo resí-
25 duos de lisina, como descrito no documento nº WO 93/00109, supra. O polioliol empregado pode ser qualquer polímero de poli(óxido de alquilenos) solúvel em água e pode ter uma cadeia linear ou ramificada. Os polióis apropriados incluem aqueles substituídos em uma ou mais posições de hidroxilas com um grupo químico, tal como um grupo alquila que tem entre um e quatro á-
30 tomos de carbono. Tipicamente, o polioliol é um poli(alquilenoglicol), tal como polietilenoglicol (PEG), e o processo de conjugar o polioliol a um polipeptídeo é denominado "peguilação". Entretanto, os versados nessas técnicas devem

reconhecer que outros polióis, tais como, por exemplo, polipropilenoglicol e copolímeros de polietilentoglicol/polipropilenoglicol, podem ser empregados usando as técnicas para conjugação aqui descritas para PEG.

O peso molecular médio do PEG empregado na peguilação do Apo-2L pode variar, e tipicamente pode ficar na faixa entre cerca de 500 e cerca de 30.000 dáltons (D). De preferência, o peso molecular médio do PEG é entre cerca de 1.000 e cerca de 25.000 D, e mais preferivelmente, entre cerca de 1.000 e cerca de 5.000 D. Em uma modalidade, a peguilação é conduzida com um PEG que tem um peso molecular médio de cerca de 1.000 D. Opcionalmente, o homopolímero de PEG é não-substituído, mas ele pode ser também substituído em uma extremidade com um grupo alquila. De preferência, o grupo alquila é um grupo alquila de C₁-C₄, e mais preferivelmente, um grupo metila. As preparações de PEGs estão disponíveis comercialmente, e tipicamente essas preparações de PEG apropriadas para uso na presente invenção são preparações não-homogêneas comercializadas de acordo com o peso molecular médio. Opcionalmente, um trímero de Apo-2L deve ser peguilado de uma maneira tal que uma molécula de PEG fique ligada ou conjugada a um, dois, ou cada um dos três monômeros que formam o Apo-2L trimérico. Nessa modalidade, prefere-se que o PEG empregado tenha um peso molecular médio de cerca de 1.000 a cerca de 5.000 D. Contempla-se também que os trimeros de Apo-2L possam ser "parcialmente" peguilados, isto é, apenas um ou dois dos três monômeros que formam o trímero são ligados ou conjugados a PEG.

Vários métodos para peguilar proteínas são conhecidos nessas técnicas. Os métodos específicos para produzir proteínas conjugadas a PEG incluem os métodos descritos nas patentes n^{os} US 4.179.337, 4.935.465 e 5.849.535. Tipicamente, a proteína é ligada de forma covalente por intermédio de um ou mais resíduos de aminoácidos da proteína a um grupo terminal reativo no polímero, dependendo principalmente das condições da reação, do peso molecular do polímero, etc. O polímero com o(s) grupo(s) reativo(s) é aqui designado como polímero ativado. O grupo reativo reage seletivamente com os grupos livres ou outros grupos reativos na proteína. O polímero

PEG pode ser acoplado ao grupo amino ou outro grupo reativo na proteína de uma maneira aleatória ou específica de sítio.

B.2 Cristalização de Apo2L/TRAIL

5 A cristalização é amplamente utilizada para a purificação de moléculas pequenas. Entretanto, geralmente, as técnicas de cristalização não têm sido amplamente aplicadas para proteínas, pois vários parâmetros podem afetar a cristalização das proteínas, incluindo, por exemplo, a solubilidade, nucleação e velocidade de crescimento, e a distribuição do tamanho dos cristais (cada uma sendo função de outros parâmetros, tais como solubili-
10 dade, temperatura, pH, tampão, impurezas, e similares). Como as proteínas são geralmente mais difíceis de cristalizar do que moléculas pequenas, a recuperação e a purificação de proteínas terapêuticas até agora raramente envolveu uma etapa ou etapas de cristalização.

A requerente descobriu surpreendentemente que o estado sólido da proteína Apo2L/TRAIL a 5°C é cristalino em condições de intensidade iônica moderada a baixa, diferentemente de muitas outras proteínas conhecidas nessas técnicas que são solúveis ou formam precipitados amorfos sob condições similares. Além disso, descobriu-se que o estado sólido dos cristais de Apo2L/TRAIL solubiliza de forma reversível quando levado para a
15 temperatura ambiente, sem uma perda na atividade biológica da proteína ou um efeito adverso sobre as propriedades bioquímicas da proteína. Esta observação foi bastante diferente da desnaturação ou precipitação irreversível observada com outras proteínas conhecidas nessas técnicas.

Opcionalmente, os cristais de Apo2L/TRAIL são preparados resfriando uma solução supersaturada da proteína Apo2L/TRAIL de cerca de 20 a cerca de 30°C até abaixo de cerca de 15°C, de preferência cerca de 2 a 8°C, mais preferivelmente abaixo de cerca de 2-8°C, ainda mais preferivelmente abaixo de cerca de 4°C, e com a maior preferência, até cerca de 2 a 4°C. opcionalmente, a concentração de Apo2L/TRAIL pode ser acima de 3
25 g/L, para iniciar a cristalização espontânea. Anti-solventes podem ser usados para iniciar a cristalização espontânea em concentrações mais baixas da proteína. A cristalização pode ser conduzida em modo de batelada ou
30

semibatelada em uma faixa grande de escala de produção, desde alguns mililitros até centenas de litros de solução. A velocidade da cristalização pode ser controlada por resfriamento e agitação programadas. Os equipamentos podem incluir, porém sem limitações, tanques agitados ou estáticos com controle da temperatura superficial e/ou interna. Chicanas internas e tubos de aspiração também podem ser usados para intensificar a mistura em tanques agitados. A nucleação dos cristais também pode ser controlada por 5 sementeira (Moore, "AIChE Practical Engineering Perspectives, Distillation and Other Industrial Separations", páginas 239-245). O grau de supersaturação, a composição de sais, a velocidade do resfriamento, a velocidade da agitação, e a sementeira, dentre outros parâmetros, podem afetar a velocidade de formação dos cristais, a distribuição do tamanho dos cristais, e o rendimento dos cristais. 10

Opcionalmente, para preparar os cristais, a solução da proteína Apo2L/TRAIL contém sulfato de sódio ou cloreto de sódio. Opcionalmente, a 15 concentração de sais é cerca de 100 mM a cerca de 200 mM, e opcionalmente, o pH é cerca de 6 a cerca de 9 (de preferência, pH de cerca de 6,6 a cerca de 8,5).

B.3 Uso de Cristalização na Recuperação e Purificação de Apo2L/TRAIL

20 Nos métodos da presente invenção, a cristalização é uma etapa na recuperação e purificação de Apo2L/TRAIL, e opcionalmente, é uma etapa em um esquema com uma coluna ou duas colunas para a recuperação e purificação de Apo2L/TRAIL.

Em uma modalidade específica, Apo2L/TRAIL é purificada a partir de uma cultura ou lisado de células hospedeiras recombinantes, ou lisado 25 celular clarificado, usando um processo de purificação que inclui uma etapa de cristalização. Caso Apo2L/TRAIL seja produzida em *E. coli*, tipicamente o caldo celular integral é colhido e homogeneizado para abrir as células de *E. coli* e liberar Apo2L/TRAIL solúvel dentro do citoplasma. Depois de remover os resíduos sólidos, por exemplo, por centrifugação, a mistura é carregada e 30 uma resina cromatográfica de troca catiônica, tal como, por exemplo, SP-Sepharose Fast Flow ou CM-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia,

Suécia). Os protocolos típicos para purificar Apo2L/TRAIL a partir do caldo celular obtido por fermentação de *E. coli* são fornecidos nos Exemplos 2 e 3.

Em um protocolo típico, o pH do caldo celular integral obtido por fermentação as células de *E. coli* é ajustado para cerca de 7,5, por exemplo, pela adição de HEPES sódico ou qualquer outro tampão apropriado. De preferência, um agente redutor, tal como 1,4-ditio-treitol (DTT) ou β -mercaptoetanol é adicionado, para impedir a formação de ligações dissulfeto entre monômeros ligados de forma não-covalente de Apo2L/TRAIL. As células são abertas por uma ou mais passagens em um homogeneizador de alta pressão disponível no mercado, os resíduos celulares são removidos, e o lisado celular é clarificado. Os parâmetros específicos do tratamento, tais como seleção e concentração de reagentes, dependem da composição do caldo celular integral de partida, tal como, por exemplo, a densidade das células.

A mistura que contém Apo2L/TRAIL, tal como um lisado de células clarificado, é então carregada em uma primeira coluna cromatográfica, usando uma resina de troca catiônica. A cromatografia de troca catiônica retém biomoléculas pela interação de grupos carregados que são de natureza ácida sobre a superfície da resina com histidina, lisina e arginina. As resinas de troca catiônica estão disponíveis comercialmente como linhas de produto de vários fabricantes, tal como, por exemplo, Sigma Aldrich. As resinas trocadoras de cátions incluem resinas portadoras, por exemplo, de grupos funcionais carbóxi-metila (trocador catiônico fraco, tal como CM celulose Sephadex) ou grupos funcionais de ácido sulfônico (trocador catiônico forte, tal como SP Sephadex). Na primeira etapa de purificação cromatográfica dos métodos da presente invenção, são preferidas colunas de troca catiônica forte, por exemplo, SP-Sepharose[®], trocadoras catiônicas fortes Spectra/Gel[®], etc. As trocadoras catiônicas fortes TSKgel, etc., são preferidas. No caso de uma coluna com SP-Sepharose[®], a matriz de agarose reticulada com grupos funcionais negativamente carregados se liga a Apo2L/TRAIL, e ao mesmo tempo, permite que a maioria das impurezas e as variantes de Apo2L/TRAIL atravessem a coluna. A eluição pode ser realizada usando

eluição com gradiente de sais, ou uma eluição em etapas, sendo preferida a eluição em etapas, pois ela proporciona melhores condições para a etapa de cristalização subsequente, sem comprometer os rendimentos. O tampão de eluição contém usualmente cloreto de sódio ou sulfato de sódio, e a concentração de sal é selecionada para atender às demandas da coluna de troca catiônica e da etapa de cristalização subsequente. A coluna de SP-Sepharose® precisa uma concentração de sal razoavelmente alta para remover a proteína Apo2L/TRAIL ligada, enquanto que para a etapa de cristalização subsequente são preferidas concentrações de sal relativamente baixas, para baixa a solubilidade da proteína. Tipicamente, são usadas concentrações de Na₂SO₄ cerca de 100-150 mM e 100-200 mM de NaCl. Um tampão de eluição típico consiste em NaCl 200 mM, HEPES 50 mM, 0,5% de Triton X-100, DTT 1 mM, pH 7,5.

A concentração de Apo2L/TRAIL na troca catiônica, por exemplo, no *pool* de eluição de SP-Sepharose®, influencia o rendimento teórico para a etapa de cristalização seguinte. A concentração deve ser alta o suficiente para maximizar as diferenças de solubilidade em temperaturas mais baixas, mas não alta demais para disparar a cristalização espontânea na temperatura ambiente ou ao redor dela.

Em um protocolo representativo, duas etapas de lavagem são empregadas entre o carregamento e a eluição da proteína Apo2L/TRAIL. A primeira lavagem usa tampão de equilíbrio, e a segunda é uma lavagem com sal, usando um tampão idêntico ao tampão de eluição subsequente, exceto que se usa uma concentração mais baixa do sal (por exemplo, NaCl 100 mM em vez de NaCl 200 mM).

A etapa de eluição de SP, que inclui duas etapas de lavagem, produz tipicamente concentrações de Apo2L/TRAIL ao redor de 3-6 g/L, tal como 5 g/L com rendimentos ao redor de 80-90%. A etapa de lavagem com sal resulta em perda da proteína ativa; portanto, removendo esta etapa, o rendimento pode ser aumentado até acima de 95%. Entretanto, a eliminação desta etapa diminui também a capacidade de a coluna remover endotoxinas e proteínas extracelulares, baixando desta forma a pureza.

O *pool* de eluição que deixa a coluna de troca catiônica é submetido à cristalização diretamente sem qualquer etapa de purificação adicional, mas opcionalmente, inclui filtração estéril. A cristalização é realizada tipicamente diminuindo gradualmente a temperatura de cerca de 15-30°C para cerca de 2 a 8°C em um período de tempo que pode se estender até 60 horas, mas é tipicamente mais curto, tal como, por exemplo, cerca de uma a 8 horas.

Em um processo de cristalização típico, o *pool* de eluição que deixa a coluna de troca catiônica é transferido para dentro de um tanque com temperatura controlada sob agitação adequada. É importante assegurar que o vaso e a solução de proteína estejam isentos de quaisquer particulados sólidos, para evitar a nucleação baseada nesses particulados sólidos, que influenciaria a cinética da cristalização. Para aplicações em pequena escala, pode ser usado, por exemplo, um vaso de reação Applikon® de 1 ou 2 litros. No vaso de 1 L, a temperatura é controlada por intermédio de serpentinas de refrigeração imersas no vaso. O vaso de reação de 2 litros contém uma camisa de troca térmica. Uma rampa de temperatura pode ser produzida em ambos vasos usando um banho de troca de calor programável (por exemplo, um Circulador de Temperatura Programável PolyScience Modelo 1157). O vaso é usualmente equipado com um agitador para misturar intensamente a solução, e deixar em suspensão os cristais depois de formados. A velocidade da agitação é tipicamente ao redor de 250 rpm para uma escala de 0,4 L e é ajustada para *pools* maiores mantendo uma razão constante de potência para volume, proporcional a N^3/V (agitador com diâmetro constante).

Descobriu-se que a solubilidade de Apo2L/TRAIL aumenta com a concentração crescente de sal, e Apo2L/TRAIL é igualmente solúvel em sulfato de sódio e cloreto de sódio. Os cristais formados em cloreto de sódio têm uma espessura mais exagerada em comparação com os cristais formados em sulfato de sódio, que têm uma aparência mais achatada. Como resultado, os cristais produzidos em cloreto de sódio são mais fáceis de separar por filtração, o que torna o cloreto de sódio o sal preferido. Como tampões de

fundo, HEPES e TRIS fornecem tipicamente resultados comparáveis.

A solubilidade de Apo2L/TRAIL diminui com o aumento do pH dentro de uma faixa de cerca de pH 7,0 a 8,0. Um pH mais alto tende a aumentar os rendimentos, mas pode produzir cristais com uma aparência mais amorfa. Além disso, os cristais são maiores em pH mais alto, mas também mais frágeis. Tendo em vista estas considerações, um pH preferido, que produz a morfologia desejada dos cristais, é $7,3 \pm 0,1$.

A rampa de temperatura usada durante a cristalização (tipicamente entre aproximadamente a temperatura ambiente e cerca de 2°C) não teve qualquer efeito significativo sobre o tamanho dos cristais ou a distribuição do tamanho dos cristais entre cerca de uma e 24 horas. A rampa de temperatura pode ser linear, mas uma taxa de resfriamento não-linear também pode ser usada para melhorar ainda mais o perfil do tamanho dos cristais mantendo um nível constante de supersaturação à medida que a cristalização progride. Como Apo2L/TRAIL não cristaliza espontaneamente nos sistemas de tampões da presente invenção até que a temperatura esteja abaixo de cerca de 8°C , de preferência abaixo de cerca de 5°C , é possível baixar rapidamente a temperatura até cerca de 10°C , e depois resfriar lentamente o *pool* para permitir a cristalização.

O tamanho dos cristais é influenciado pela velocidade de agitação. Ao testar três velocidades diferentes da agitação (100 rpm, 175 rpm e 250 rpm), a cristalização demonstrou ser mais rápida com a velocidade de agitação maiores, mas a distribuição do tamanho dos cristais e a aparência dos cristais foram muito similares para as velocidades de agitação de 175 rpm e 250 rpm. Em velocidades mais baixas, os cristais ao ficarem completamente em suspensão, o pode ocorrer a agregação de cristais. Em velocidades de agitação mais altas, deve-se tomar cuidado para não danificar a proteína solúvel pela exposição a efeitos de cisalhamento na interface ar/líquido.

A eficiência da cristalização pode ser melhorada baixando a solubilidade de Apo2L/TRAIL. Assim sendo, o rendimento global da etapa de cristalização é controlado em parte pela solubilidade de Apo2L/TRAIL no

pool gelado da primeira coluna de cromatografia por troca catiônica. Os dois fatores que afetam o rendimento são a concentração inicial de Apo2L/TRAIL no *pool* de eluição coletado a partir da primeira coluna (por exemplo, SP) de cromatografia de troca catiônica, e a concentração de Apo2L/TRAIL solúvel na lama de cristais (isto é, a quantidade de Apo2L/TRAIL que não cristaliza). Apo2L/TRAIL que ainda está em solução depois da cristalização será perdida durante a filtração. A adição de anti-solventes pode mudar a química da solução para baixar a solubilidade no equilíbrio.

Rendimento percentual teórico = $\frac{[Apo2L]_{22C} - [Apo2L]_{40}}{[Apo2L]_{22C}} \times 100$, onde os números subscritos indicam valores de temperatura

Reduzindo Apo2L/TRAIL em solução, menos proteína é removida quando o licor-mãe é removido por filtração. O anti-solventes, conhecidos também como agentes precipitantes, são bem-conhecidos nessas técnicas e podem funcionar de uma série de maneiras. Alguns anti-solventes desidratam a solução absorvendo água. Isto essencialmente reduz a atividade da água disponível para dissolver a proteína (vide McPherson, A., 1998, "Crystallization of Biological Macromolecules", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY).

Um anti-solvente amplamente utilizado é o polietilenoglicol (PEG), um polímero disponível em uma ampla série de pesos moleculares. Como ilustrado nos exemplos, nos métodos da presente invenção, um PEG com peso molecular mais alto (3.350 e 10.000) produziu resultados melhores. Outros polímeros que podem ser usados como anti-solventes incluem, por exemplo, Eudragit RS, etil-celulose, álcool isopropílico, etanol, dioxano e 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD).

Quando a cristalização está completada, os cristais de Apo2L/TRAIL são removidos, por exemplo, por filtração. Os cristais podem ser mantidos em suspensão durante a etapa de filtração inteira, usando um agitador embutido, ou podem ser depositados em um leito compactado. É importante evitar a formação de uma torta comprimida de cristais, o que poderia tornar difícil atingir a vazão desejada. Portanto, pressões diferenciais através do leito compactado devem ser minimizadas. As vazões podem vari-

ar, e são tipicamente entre cerca de 200 cm/h e cerca de 100 cm/h. A vazão pode depender do equipamento usado, e do diferencial de pressão aplicado durante a filtração. A filtração pode ser realizada em batelada ou continuamente. Uma purificação adicional pode ser conseguida, por exemplo, lavando o leito de cristais depositado com uma solução que não dissolve substancialmente os cristais de Apo2L/TRAIL, tal como uma solução gelada (2-8°C) de TRIS de baixa molaridade em pH de cerca de 7,5.

Depois da cristalização e separação, os cristais de Apo2L/TRAIL podem ser dissolvidos e estocados ou convertidos em uma formulação apropriada para o uso pretendido.

Alternativamente, uma outra etapa de purificação cromatográfica pode ser adicionada para melhorar ainda mais a pureza removendo os resíduos do anti-solvente (PEG) e os componentes do tampão, e reduzir os níveis de proteínas extracelulares residuais, endotoxinas, dímeros e agregados. A segunda coluna cromatográfica, usada depois da cristalização, pode ser uma coluna de troca catiônica, ou uma coluna de interação hidrofóbica. Como o *pool* de cristalização é muito puro, não é tipicamente necessário usar um modo de separação "ligar e eluir" (tal como usado tipicamente com SP-Sepharose ou CM-Sepharose), uma coluna "flow-through", tal como a resina de HIC Phenyl-Sepharose, tipicamente demonstrará um bom desempenho. O uso de ambos tipos de resinas, troca catiônica em um modo de "ligar e eluir" e HIC em modo "flow-through", foi testado e os resultados estão discutidos nos exemplos. Descobriu-se que, enquanto que uma etapa de ligação e de cromatografia com eluição em etapas proporciona uma ferramenta muito potente para a purificação inicial, na segunda etapa de purificação cromatográfica, a cromatografia por interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose é suficiente para produzir a pureza e os rendimentos desejados. Como esta é uma etapa "flow-through", ela produz rendimentos excelentes e reduz o número de soluções necessário para completar a operação em comparação com a cromatografia de ligar e eluir.

B.4 Uso de Apo2L/TRAIL

Os métodos da presente invenção proporcionam uma alternativa

eficaz, eficiente e econômica a, por exemplo, protocolos de purificação que requerem múltiplas purificações em colunas. Como discutido acima, em uma modalidade, o esquema de purificação da presente invenção envolve o uso de uma única coluna de troca catiônica, e em seguida, cristalização. Os cristais de Apo2L/TRAIL obtidos pelo método da presente invenção podem ser secos para estocagem. A secagem do material cristalino pode reduzir também substancialmente o volume de estocagem, e proporcionar uma maneira eficaz para estocagem a granel que evita congelamento do material purificado em baixa concentração na solução da formulação. A lama de cristais em concentração muito alta da proteína pode ser congelada em recipientes com volumes menores.

Em outra modalidade, os cristais de Apo2L/TRAIL são coletados e lavados com tampão (ou água) (de preferência, um tampão gelado em uma temperatura de cerca de 2 a 8°C). Os cristais lavados podem ser recolocados em suspensão ou redissolvidos à temperatura ambiente. Apo2L/TRAIL solubilizada novamente pode ser purificada adicionalmente por cromatografia de interação hidrofóbica ou uma segunda cromatografia de troca catiônica, como descrito acima, lavada e estocada como um material cristalino úmido a granel. Alternativamente, a etapa de cromatografia por interação hidrofóbica ou outra etapa de cromatografia pode ser omitida em favor de simplesmente recristalizar.

O material cristalino úmido a granel pode ser estocado a -20°C ou secado para estocagem à temperatura ambiente ou a 2-8°C. De preferência, o material cristalino secado é solubilizado novamente em uma formulação que contém succinato de arginina. Opcionalmente, esta formulação pode ser filtrada de forma estéril e/ou envasilhada em frascos de dosagens individuais, e liofilizada para reconstituição ou suspensão posterior. Opcionalmente, a formulação cristalina seca pode ser envasilhada como um pó em frascos e transformada em uma solução ou suspensão. Pode ser desejável atingir um teor de água de cerca de 5% a cerca de 10% nos cristais de Apo2L/TRAIL secos.

As formulações de Apo2L/TRAIL podem ser empregadas em

uma série de aplicações terapêuticas e não-terapêuticas. Dentre estas aplicações estão métodos para tratar distúrbios tais como câncer, condições relacionadas ao sistema imunológico, ou condições virais. Estas aplicações terapêuticas e não-terapêuticas estão descritas adicionalmente, por exemplo, nos documentos n^{os} WO 97/25428, WO 97/01633 e WO 01/22987.

Nos métodos da invenção para tratar um distúrbio usando uma formulação aqui descrita, a formulação de Apo2L/TRAIL pode ser administrada diretamente ao mamífero por qualquer técnica apropriada, incluindo infusão ou injeção. A via de administração específica dependerá, por exemplo, do histórico médico do paciente, incluindo quaisquer efeitos colaterais percebidos ou previstos, usando Apo2L/TRAIL, e do distúrbio a ser corrigido. Os exemplos de administração parenteral incluem administração subcutânea, intramuscular, intravenosa, intra-arterial e intraperitoneal da composição. As formulações são administradas, de preferência, como injeções ou infusões intravenosas (iv), subcutâneas (sc), intramusculares (im) repetidas, infusões intracranianas ou como formulações de aerossóis apropriadas para distribuição intranasal ou intrapulmonar (para distribuição intrapulmonar, vide, por exemplo, documento n^o EP 257.956).

Assinala-se que a pressão osmótica de injeções pode ser importante em injeção subcutânea e intramuscular. As soluções para injeção, quando hipotônicas ou hipertônicas, podem causar dor a um paciente depois da infusão. Usualmente, para as formulações terapêuticas injetáveis neste caso, refere-se que a osmolaridade relativa da solução injetável seja de cerca de 300 mosm a cerca de 600 mosm.

Apo2L/TRAIL pode ser administrada também na forma de preparações com liberação prolongada. Os exemplos apropriados de preparações com liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros sólidos hidrofóbicos que contêm a proteína, matrizes estas que estão na forma de artigos modelados, como por exemplo, filmes ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes com liberação controlada incluem derivados de celulose (por exemplo, carbóxi-metil-celulose), isobutirato de acetato de sacarose (SABER[®]) em meios não-aquosos, poliésteres, hidrogéis (por exemplo,

poli(metacrilato de 2-hidróxi-etila) (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105 (1982), ou poli(álcool vinílico)), polilactídeos (patente nº US 3.773.919, documento nº EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de gama-etila (Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22:547-556 (1983)), copolímero de etileno e acetato de vinila não-degradável (Langer *et al.*, *supra*), copolímeros de ácido láctico e ácido glicólico degradáveis, tal como o Depósito Lupron (microsféras injetáveis constituídas de ácido láctico e ácido glicólico, e acetato de leuprolida), e poli(ácido D-(-)-3-hidróxi-butírico) (documento nº EP 133.988). Um método opcional para a distribuição de fármacos com atuação sistêmica envolve a administração por infusão contínua (usando, por exemplo, dispositivos com liberação lenta ou minibombas tais como bombas osmóticas ou emplastos cutâneos), ou por injeção (usando, por exemplo, meios intravenosos ou subcutâneos, incluindo administração maciça única).

15 A composição a ser usada na terapia deve ser formulada e dosada de uma maneira consistente com a boa prática médica, levando em conta a condição clínica do paciente individual, o local de distribuição da composição, o método de administração, a cronologia da administração, e outros fatores conhecidos pelos profissionais. As "quantidades eficazes" de cada componente para os presentes propósitos são, assim, determinadas por essas considerações e são quantidades que resultam em biodisponibilidade de Apo2L/TRAIL ou outros fármacos para o mamífero.

25 Como proposição genérica, a quantidade farmacologicamente eficaz total dos polipeptídeos Apo2L/TRAIL, administrada, deve ficar na faixa entre cerca de 1 mg/kg/dia e cerca de 20 mg/kg/dia, baseado no peso corporal em quilogramas do paciente, embora, como assinalado acima, isto deve estar sujeito ao critério terapêutico.

30 Embora a injeção seja preferida, um dispositivo de infusão também pode ser empregado para infusões contínuas. Uma solução intravenosa em bolsa também pode ser empregada.

Contempla-se que mais terapias adicionais possam ser empregadas nos métodos. Uma ou mais terapias adicionais podem incluir, porém

sem imitações, administração de terapia de radiação, citocinas, agentes inibidores do crescimento, agentes quimioterápicos, agentes citotóxicos, inibidores de tirosina cinase, inibidores de ras farnesil transferase, inibidores de angiogênese, e inibidores de cinases dependentes de ciclinas que são conhecidos nessas técnicas e definidos adicionalmente com particularidade na Seção I acima. Além disso, terapias baseadas em anticorpos terapêuticos que assestam antígenos de tumores-alvo tais como Rituxan® ou Herceptin®, bem como anticorpos anti-angiogênicos tais como anti-VEGF, ou anticorpos que assestam receptores de Apo2L, tais como DR5 ou DR4.

10 A preparação e os cronogramas de dosagem para agentes quimioterápicos podem ser usados de acordo com as instruções dos fabricantes ou como determinado empiricamente pelos versados nessas técnicas. A preparação e os cronogramas de dosagem para tais quimioterapias estão descritos também em "Chemotherapy Service", Editor M.C. Perry, Williams & 15 Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Pode ser desejável também administrar anticorpos contra outros antígenos tais como anticorpos que se ligam a CD20, CD11a, CD18, CD40, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, fator do crescimento endotelial vascular (VEGF), ou outros membros da família de TNFR (tais como DR4, DR5, 20 OPG, TNFR1, TNFR2). Alternativamente, ou adicionalmente, dois ou mais anticorpos que se ligam aos mesmos antígenos ou dois ou mais antígenos diferentes aqui descritos podem ser co-administrados ao paciente. Em uma modalidade, as formulações de Apo2L são co-administradas com um agente inibidor de crescimento.

25 A formulação de Apo2L/TRAIL pode ser administrada concomitantemente ou seqüencialmente com esses outros agentes. Por exemplo, a formulação de Apo2L/TRAIL ou um agente quimioterápico pode ser administrado como um pré-tratamento (antes da administração de qualquer um desses agentes), tal como um pré-tratamento de células cancerosas que poderiam de outra forma ficar resistentes aos efeitos apoptóticos de 30 Apo2L/TRAIL.

A invenção fornece também *kits* que incluem uma formulação

aqui descrita. Um *kit* típico deve compreender um recipiente, de preferência um frasco, para Apo2L/TRAIL em um ou mais excipientes descritos acima; e instruções, tal como uma bula ou rótulo, orientando o usuário de como empregar a formulação de Apo2L/TRAIL. Ele deveria de preferência fornecer uma formulação farmacêutica. De preferência, a formulação farmacêutica é para tratar câncer ou uma condição relacionada ao sistema imunológico. Os recipientes apropriados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser produzidos a partir de vários materiais, tais como vidro ou plástico. O recipiente deve conter uma formulação de Apo2L/TRAIL que é eficaz para diagnosticar ou tratar o distúrbio e pode ter um orifício de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco com uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O rótulo sobre o recipiente ou associado com ele indica que a formulação é usada para diagnosticar ou tratar o distúrbio de escolha. O artigo manufaturado pode compreender ainda um segundo recipiente que compreende água para injeção, uma solução farmacêuticamente aceitável, solução salina, solução de Ringer, ou solução de dextrose. Ele pode incluir ainda outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial ou do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, e bulas com instruções para uso.

Todas patentes, pedidos de patente, publicações, descrições de produtos, e protocolos são citados neste pedido de patente inteiro, cujos teores são aqui incorporados como referência em sua totalidade.

Exemplos

Os exemplos que se seguem são oferecidos com propósito meramente ilustrativo, e não devem ser entendidos de forma alguma como limitativos do escopo da presente invenção. Os reagentes disponíveis no mercado citados nos exemplos foram usados de acordo com as instruções do fabricante, a menos que diferentemente indicado. O fornecedor das células identificadas nos exemplos que se seguem, e neste relatório descritivo inteiro, pelos números de acesso da ATCC, é a American Type Culture Collection, Manassas, Virgínia.

Exemplo 1

Produção de Apo2L/TRAIL em *E. coli* e Purificação por Múltiplas Etapas Cromatográficas (sem cristalização)

5 A. A proteína Apo2L/TRAIL, consistindo nos aminoácidos 114-281 (vide Figura 1), foi expressada em *E. coli* sob o controle do promotor AP (preparação e expressão descritas no Exemplo 8 (Seção A) do documento nº WO 01/00832, publicado em 4 de janeiro de 2001), e purificada a partir dos lisados de células de *E. coli* por três etapas cromatográficas que consistem em cromatografia de troca catiônica, com hidroxapatita e de interação
10 hidrofóbica (documento nº WO 01/00832, Exemplo 8, Seção C). Na terceira separação cromatográfica, a proteína Apo2L/TRAIL foi eluída em sulfato de sódio 600 mM ou sulfato de amônio 400 mM, Tris 50 mM, pH 7,5.

B. Outro método para purificação de Apo2L/TRAIL consistiu em quatro etapas de cromatografia de duas etapas de ultrafiltração/diafiltração
15 (UFDF). O caldo celular integral obtido a partir do processo de produção de *E. coli* foi homogeneizado para abrir as células de *E. coli* e liberar Apo2L/TRAIL solúvel mantida dentro do citoplasma. Os detritos celulares sólidos foram então removidos por centrifugação.

O isolamento primário foi realizado por ligação e gradiente de eluição em uma coluna de troca catiônica (CEX) (coluna de SP-Sepharose
20 Fast Flow). O eluído foi então transferido para uma coluna de cromatografia com hidroxapatita (HA), e em seguida, cromatografia por interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose). Depois de uma etapa de ultrafiltração/diafiltração (UFDF), a mistura foi carregada em ma coluna de CM-Sepharose, e a prote-
25 ína eluída foi concentrada por uma etapa final de UFDF.

Exemplo 2

Cristalização de Apo2L/TRAIL como um Método de Recuperação e Purificação Depois de Purificação em Uma Coluna

A propensão de cristalização de Apo2L/TRAIL em soluções de sulfato de sódio foi usada como um meio para purificar a proteína
30 Apo2L/TRAIL a partir de extratos de *E. coli*. O protocolo que se segue foi empregado para a recuperação e purificação de Apos2L/TRAIL recombinan-

te sem efeito adverso sobre a qualidade da proteína.

O caldo celular integral colhido, derivado de *E. coli* (descrito no Exemplo 1) teve seu pH ajustado para pH 7,5 com HEPES 1,5 M (ou Tris 1,5 M) e depois homogeneizado em um homogeneizador (Gaulin Corporation, 5 Everett, MA) a 44,82 MPa (6.500 psi). O homogeneizado foi diluído até 1 com DTT 5 mM em água purificada. Depois que a solução atinge a temperatura ambiente, 5% de polietilenoimina (PEI) são adicionados para dar uma concentração final de 0,1%, e a solução foi floculada por 1-2 horas. O material floculado foi centrifugado com uma centrífuga com alimentação contínua 10 BTPX20 (Alfa Laval Separation AB, Suécia) e clarificado por filtração profunda. O lisado (extrato) celular clarificado foi condicionado com Triton X-100 até uma concentração final de 0,05%. O lisado celular clarificado condicionado foi então carregado em uma coluna de troca catiônica (resina de troca catiônica SP-Sepharose FF, Amersham Pharmacia, Suécia) equilibrada em 15 Hepes 50 mM (ou Tris 50 mM)/0,05% de Triton X-100/DTT 1 mM, pH 7,5. A Apo2L/TRAIL se ligou à coluna, enquanto que as proteínas não ligadas escoaram através da coluna e foram removidas lavando com tampão de equilíbrio até que a absorvância a 280 nm atingisse o referencial. A coluna foi então lavada com 3 volumes da coluna de NaCl 0,1 M em tampão de equilí- 20 brio. A Apo2L/TRAIL foi eluída em etapas usando NaCl 0,1 M (ou Na₂SO₄ 0,1 M) em Hepes, TRis e trietanol-amina, todos 50 mM, 0,05% de tampão de Triton X-100 e DTT 1 mM, pH 7,8.

O *pool* de Apo2L/TRAIL à temperatura ambiente coletado da 25 coluna SP foi colocado em um tanque de aço inoxidável com uma camisa isolada para aquecimento e resfriamento. O tanque foi equipado com um fundo cônico e uma válvula de descarga no fundo para recuperação máxima da proteína cristalizada. O *pool* foi agitado usando uma hélice do tipo naval sob condições de misturação leves. Usou-se um controle para descender a temperatura de aproximadamente 25°C até aproximadamente 4°C durante o 30 curso de uma hora. A cristalização espontânea foi observada dentro de minutos depois que o *pool* atingiu 4°C. Depois de mais de 12 horas sob estas condições, a cristalização se completou à medida que a solubilidade em e-

quilíbrio estivesse quase estabelecida. Os cristais foram então capturados em um conjunto de filtração contendo de uma frita de polipropileno de 20 µm. Depois da deposição dos cristais sobre a superfície do filtro, os cristais foram lavados com Tris 20-50 mM gelado em pH 7,5. Um volume igual do
5 tampão de lavagem em comparação com o volume do pool de Apo2L/TRAIL SP foi então usado para remover o licor-mãe (sobrenadante) residual dos cristais depositados. Depois da lavagem, os cristais foram dissolvidos em sulfato de sódio 100 mM/Tris 20 mM em pH 7,5 recirculando o tampão de
10 dissolução através do leito de cristais a aproximadamente 30°C. A dissolução dos cristais foi observada dentro de aproximadamente 4 horas. Apo2L/TRAIL purificada dissolvida foi então filtrada de forma estéril para dentro de um recipiente e estocada congelada a -70°C.

A pureza das preparações de Apo2L/TRAIL foi determinada pelos ensaios ELISA de proteína total (ECP) em *E. coli*, ensaio de Lisado do
15 Amebócito Límulo (LAL), e coloração prata SDS-PAGE. ECP ELISA foi realizado immobilizando anticorpos anti-ECP integral caprino purificado por afinidade sobre poços de placas de microtitulação, incubando as amostras e depois com ECPs conjugados com peroxidase de rábano. A atividade enzimática da peroxidase foi então quantificada com o-fenilenodiamina lendo a absorvância a 490 nm em uma leitora de placas de microtitulação. O nível de
20 endotoxinas foi determinado usando o ensaio de lise de coágulo do amebócito límulo. A coloração prata com SDS-PAGE foi realizada em um gel de poliacrilamida com gradiente de 10 a 20% (Daiichi Pure Chemicals) em tampão de Tris-glicina, contendo 0,1% de SDS. A eletroforese foi conduzida em
25 uma corrente constante de 50 mA até que o corante atingisse a proximidade do fundo do gel. Os géis foram fixados e corados por métodos com Azul Brilhante de Coomassie ou coloração prata de Merrill.

A qualidade da proteína foi avaliada por SEC, SDS-SEC, IEX, e a bioatividade, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 1.

30 A pureza e a qualidade de Apo2L/TRAIL recuperada usando o método de cristalização acima em uma escala de fermentação de 60 L estão indicadas na Tabela 1. Para comparação, um padrão referencial purificado

por um método de três etapas cromatográficas, como descrito no Exemplo 1, também está indicado.

Tabela 1

Preparação de Apo2L/TRAIL	Pureza da Proteína			Qualidade da Proteína			
	ECP (ppm)	LAL (EU/mg)	SDS-PAGE	% de trímero por SEC	% de monômero por SEC	Bioatividade, % do controle ($\pm 20\%$)	% de IEX pico principal
Apo2L/TRAIL purificada por cristalização	10	0,034	Nenhuma banda em 10 kDa	99,0	99,0	126	63
Material referencial purificado por cromatografia-padrão	0,82	0,023	Banda em ~10 kDa	98,9	98,9	86	61

Como indicado na Tabela 1, a preparação de Apo2L/TRAIL em uma escala de fabricação teve um alto grau de pureza apropriado para uso terapêutico. Os dados indicam que a proteína Apo2L/TRAIL purificada na etapa de “uma coluna” é suscetível à cristalização e tem uma pureza comparável ou melhor do que a proteína Apo2L/TRAIL purificada pelo método de purificação em três colunas, descrito no Exemplo 1. A Figura 3 ilustra o efeito do tipo de sal sobre a cristalização de uma Apo2L/TRAIL purificada na etapa de uma coluna. O “envenenamento” da cristalização por cátions bivalentes foi observado no caso de Apo2L/TRAIL parcialmente purificada (Figura 3).

As propriedades bioquímicas de Apo2L/TRAIL também não foram afetadas adversamente pela cristalização de Apo2L/TRAIL parcialmente purificada (vide Tabela 1). Os dados sugerem que a cristalização de Apo2L/TRAIL expressada recombinante, quando em um estado parcialmente purificado, pode ser um meio eficaz, eficiente e econômico para sua purificação. Opcionalmente, tais cristais podem ser então usados para a preparação de granel seco para estocagem ou formulações com liberação controlada.

Exemplo 3

Método para Recuperação e Purificação de Apo2L/TRAIL Usando Cristalização que Inclui uma Segunda Etapa Cromatográfica depois da Cristalização (Purificação em Duas Colunas)

5 O caldo celular integral colhido a partir de *E. coli* (descrito no Exemplo 1) teve seu pH ajustado para pH 7,5 com Hepes 1,5 M (ou Tris 1,5 M). Adicionou-se DTT até 5 mM para impedir a formação de ligações dissulfeto entre os monômeros não ligados de forma covalente. Duas passagens em um homogeneizador (Gaulin Corporation, Everett, MA) a 44,82 MPa
10 (6.500 psi) romperam as células de *E. coli*. O lisado foi então diluído até 1 com DTT 5 mM em água purificada. Depois que a solução atingiu a temperatura ambiente, 5% de PEI foram adicionados para dar uma concentração final de 0,2% de PEI. A PEI causou a floculação dos sólidos celulares, e o material foi misturado por pelo menos 30 min antes de centrifugar, para per-
15 mitir a floculação completa. Depois da centrifugação, o lisado clarificado foi filtrado usando um filtro profundo Cuno Maximizer 30/60SP (Cuno Incorporated, Meriden, CT). Antes de carregar o lisado clarificado em uma coluna de SP Sepharose, o pH foi ajustado para 7,5 usando Hepes Na 1 M, e a condutividade foi ajustada para abaixo de 9,5 mS/cm usando DTT 5 mM em água.

20 Da mesma forma que no método de purificação do Exemplo 2, a resina SP-Sepharose, uma resina de troca catiônica forte, foi escolhida para a etapa de captura primária. A matriz de agarose reticulada com grupo negativamente carregados se ligou a Apo2L/TRAIL, enquanto que a maior parte das impurezas e variantes de Apo2L/TRAIL atravessaram a coluna. As se-
25 guintes condições do tampão foram usadas: NaCl 200 mM, HEPES 50 mM, 0,05% de Triton X-100, DTT 1 mM, pH 7,5.

A cristalização do *pool* de eluição de SP foi conseguida com uma rampa de temperatura controlada de 22°C até 4°C durante um intervalo de 4 horas. O *pool* de eluição de SP foi filtrado de forma estéril e transferido
30 para um tanque com temperatura controlada sob boa agitação. Foi importante assegurar que o tanque e a solução de proteína estivessem isentos de quaisquer particulados antes da cristalização. Quando o *pool* de eluição SP

resfriou, os cristais se formaram espontaneamente com um comprimento médio da corda de 44 μm , determinado pela tecnologia de Medição de Refletância com Feixe Focalizado de Lasantec. A morfologia dos cristais era de faces hexagonais com metade da profundidade do maior comprimento da corda. Depois de reter o *pool* por aproximadamente uma a duas horas a 4°C, para permitir que a taxa de crescimento dos cristais desacelere, 50% de PEG 3350 foram adicionados para dar uma concentração final de 5% de PEG 3350. A adição de PEG 3350 (um anti-solvente) baixou a solubilidade de Apo2L/TRAIL, e promoveu mais crescimento dos cristais.

Os cristais formados foram então removidos por filtração, em batelada ou continuamente. Em ambos os casos, o licor-mãe foi removido, e os cristais foram lavados para remover as impurezas e o solvente residual. A filtração foi realizada a 2-8°C. A lama de cristais foi transferida para um filtro do tipo Büchner ou Nutsche, contendo um filtro com malha de aço sintetizado, polipropileno sinterizado ou aço de 5-20 μm sifonando ou pressurizando o tanque que contém a lama de cristais. Os cristais foram então raspados manualmente do filtro, ou dissolvidos em um sistema de tampão para a próxima etapa de purificação.

Antes de carregar em uma coluna de CM-Sepharose, os cristais foram dissolvidos em succinato de arginina 0,5 M/TRIS 20 mM, pH 7,2. Antes de carregar em uma coluna de Phenyl-Sepharose, os cristais foram dissolvidos em Na_2SO_4 0,6 mM/TRIS 50 mM, pH 7,5.

A etapa de cromatografia depois da cristalização serviu para remover o PEG e os componentes do tampão do *pool* de proteína cristalina, e para proporcionar uma remoção pelo menos moderada de ECPs, endotoxinas, dímeros e agregados.

Em um conjunto de experimentos, uma coluna de CM-Sepharose para ligar e eluir foi usada nesta etapa. Antes de carregar esta coluna, os cristais de Apo2L/TRAIL foram dissolvidos na formulação do tampão, succinato de arginina 0,5 M/TRIS 20 mM, pH 7,2, e o *pool* dissolvido foi diluído 5 vezes com TRIS 20 mM. O *pool* de cristais dissolvidos foi carregado na coluna e eluído com NaCl 125 mM/TRIS 50 mM/DTT 1 mM, pH 7,5. A

operação da coluna foi repetida várias vezes para apresentar recuperação (85-95%) e pureza consistentes.

Em outro conjunto de experimentos, foi usada uma coluna “*flow-through*”, Phenyl-Sepharose HIC. Neste caso, os cristais foram dissolvidos em Na₂SO₄ 0,6 M/TRIS 50 mM/DTT 1 mM, pH 7,5. A solubilidade de Apo2L/TRAIL era muito alta nesta solução por causa da alta concentração de sais. Três corridas tiveram consistentemente rendimentos de 98% e os cromatogramas foram quase idênticos. O nível de pureza foi alto, como observado usando a coluna de CM-Sepharose para ligar e eluir.

10 Exemplo 4

Seleção das Condições de Cristalização

O *pool* de eluição em SP-Sepharose da primeira etapa de purificação cromatográfica, descrito no Exemplo 3, foi resfriado para produzir cristais e depois aquecido para dissolver os cristais múltiplas vezes.

15 Um analisador de tamanho em tempo real (Medição de Reflexância com Feixe focalizado Lasentec – FBRM) foi usado para monitorar o comprimento da corda dos cristais e a distribuição durante o processo de cristalização inteiro. No método de FBRM, um laser é girado rapidamente em um trajeto circular. À medida que o laser passa sobre o cristal, o feixe de luz
20 é refletido por uma certa duração que é multiplicada pela velocidade do laser rotativo para dar um “comprimento de corda”.

Efeito da Taxa de Resfriamento da Temperatura

O FBRM foi usado para monitorar o perfil do crescimento dos cristais em função da taxa de resfriamento da temperatura. A taxa de resfriamento afeta o tempo necessário para a cristalização e a distribuição final do tamanho. Uma taxa de resfriamento lenta supersatura a solução lentamente e a nucleação e o crescimento dos cristais desaceleram. Um resfriamento rápido induz alta supersaturação, e se formam muitos cristais pequenos.

30 Uma declínio de temperatura linear de 22°C até 2°C durante vários períodos de tempo foi investigado. Os resultados das distribuições dos cristais no equilíbrio durante períodos de resfriamento de 1, 4, 8 e 24 horas estão ilustrados na Figura 1 e indicados na Tabela 2.

Tabela 2

Tempo de Resfriamento (hora)	Tamanho Médio (μm)	Nº de Partículas (1-32 μm)	Solubilidade (g/L)
1	38 \pm 20	810	0,81
4	43 \pm 22	560	0,74
8	39 \pm 18	550	1,0
24	44 \pm 22	500	0,82

Uma taxa de resfriamento de 4 horas proporcionou resultados aceitáveis.

Efeito da Agitação sobre o Tamanho dos Cristais

5 Aproximadamente 0,4 L do tampão de eluição SP foi cristalizado em três velocidades de agitação. Os estudos com três velocidades foram o mínimo necessário para colocar em suspensão a maioria dos cristais (100 rpm), a velocidade máxima de agitação antes de arrastes de bolhas de ar (250 rpm), e uma velocidade de agitação no meio (175 rpm). Descobriu-se

10 que a cristalização era mais rápida com a velocidade de agitação mais alta (250 rpm). A distribuição dos tamanhos dos cristais era muito similar nos experimento operados a 175 rpm e 250 rpm, e não houve diferença perceptível nas imagens microscópicas. 100 rpm não proporcionaram agitação suficiente para colocar completamente em suspensão todas as partículas. Além

15 disso, alguma agregação dos cristais foi observada. Em todos os casos, a hélice ficou perto da superfície do ar, e foi fácil arrastar ar para dentro. Em aplicações em grande escala, esta geometria poderia mudar, e velocidades de agitação mais altas podem ser usadas sem danificar a proteína pela exposição à interface ar/líquido.

20 Estudos com Anti-solventes

Os anti-solventes usados no processo de cristalização melhoram a eficiência da cristalização por baixar a solubilidade da proteína. Como qualquer proteína remanescente na solução é perdida durante a filtração, é importante levar a solubilidade para um valor tão baixo quanto possível durante a reação de cristalização.

25

Os anti-solventes foram triados enchendo seringas de 5 mL com

cristais de Apo2L/TRAIL ou *pool* de eluição SP, e depois adicionando uma quantidade apropriado do anti-solvente. As amostras foram agitadas lentamente durante um período de duas semanas à temperatura ambiente e a 2-8°C. Amostras de 1 mL foram então passadas através de um filtro de 0,22
5 μm para remover todos os cristais da proteína e depois operadas em uma HPLC IEX para determinar a concentração de Apo2L/TRAIL na solução.

Polietilenoglicol (PEG) com pesos moleculares de 400, 3.350 e 10.000 Da (PEG 440, PEG 3350 e PEG 10000, respectivamente) foi testado como anti-solvente. Os cristais de Apo2L/TRAIL foram dissolvidos no tam-
10 pão de eluição SP (NaCl 200 mM, HEPES 50 mM, 0,05% de Triton X-100, DTT 1 mM, pH 7,5) e adicionou-se o PEG. As misturas foram agitadas por 5 dias em uma temperatura de 2-8°C. Os resultados ilustrados na Figura 5 indicam que PEG 3350 e PEG 10000 são melhores do que PEG 400, e quase idênticos em termos de melhora do rendimento. A adição de 5% de PEG
15 3350 melhorou o rendimento teórico de cerca de 85% para cerca de 96% em relação à cristalização sem a adição de PEG ou qualquer outro anti-solvente.

A seguir, o efeito de etanol e álcool isopropílico sobre a solubilidade de Apo2L/TRAIL foi examinado. Ambos demonstraram proporcionar aumentos significativos do rendimento com concentrações entre 5% e 10%.
20 A solubilidade de Apo2L/TRAIL no equilíbrio ao usar esses solventes foi aproximadamente equivalente àquela com PEG.

Outros anti-solventes orgânicos usados comumente, a saber, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), etilenoglicol, e dioxano, também foram testados, mas proporcionaram pouco ou nenhum benefício em termos de redução
25 da solubilidade de Apo2L/TRAIL.

Baseado nestes estudos, determinou-se que bons resultados de cristalização e rendimentos podem ser atingidos resfriando o *pool* de eluição SP com um declínio linear da temperatura entre 22°C e 4°C, usando um período de resfriamento de 4 horas, e PEG 3350 como anti-solvente.

Exemplo 5

Processo de Purificação em Duas Colunas Usando Anti-solvente na Etapa de Cristalização

- 5 Apo2L/TRAIL foi purificada essencialmente como descrito no Exemplo 3, mas adicionando 5% de PEG 3350 durante a cristalização. Depois da cristalização, o material foi dividido em 6 coleções (*pools*). Três *pools* foram operados em uma coluna de CM-Sepharose, e 3 *pools* foram operados em uma coluna de Phenyl-Sepharose. Os resultados de rendimento e pureza estão indicados na Tabela 4 abaixo.

10 Tabela 4

Etapa	Rendimen- to da Etapa	ECP (ppm)	LAL (EU/mg)
Homogeneização		$1,6 \times 10^6$	85,3
Coluna de SP-Sepharose	89%	172,90	1,9
Cristalização	96%	9,1	1,9
Coluna de CM-Sepharose (Opção nº 1)	86%	1,3	1,02
Coluna de Phenyl-Sepharose (Opção nº 2)	98%	< 0,35	0,23

- 15 A presente invenção não está limitada em escopo pelas modalidades específicas aqui descritas. Na realidade, várias modificações da invenção além daquelas aqui descritas ficarão evidentes para os versados nessas técnicas a partir da descrição precedente e das figuras que a acompanham. Pretende-se que tais modificações caiam dentro do escopo das reivindicações apensadas.

Listagem de Seqüência

<110> GENENTECH, INC.
 FLORES, HEATHER
 LIN, TANYA P.
 MATTHEWS, TIMOTHY C.
 PAI, ROGER
 SHAHROKH, ZAHRA

<120> Formulações do Ligante APO-2/TRAIL

<130> 39766-0174P2 PCT

<140> PCT/US2006/018137

<141> 2006-05-10

<150> US 11/136,842

<151> 2005-05-24

<160> 2

<170> FastSEQ para Windows versão 4.0

<210> 1

<211> 281

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

```

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

```


REIVINDICAÇÕES

1. Método para recuperar Apo2L/TRAIL a partir de uma mistura, compreendendo

5 (a) carregar a mistura em uma coluna de troca catiônica;
(b) lavar a coluna de troca catiônica com um tampão equilibrador, com o que os componentes não-ligados presentes na mistura são removidos;

(c) eluir Apo2L/TRAIL ligada à coluna de troca catiônica com um tampão de eluição;

10 (d) gradualmente, resfriar o eluído até uma temperatura de cerca de 2 a 4°C, como o que a Apo2L/TRAIL é precipitada espontaneamente em uma forma cristalina, para produzir uma mistura de licor-mãe e cristais de Apo2L/TRAIL, e

15 (e) recuperar Apo2L/TRAIL a partir da mistura obtida na etapa (d) com uma pureza de pelo menos cerca de 99%.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a mistura carregada na coluna de troca catiônica é um meio de cultura ou lisado celular de células produtoras de Apo2L/TRAIL.

20 3. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que a dita mistura é o lisado celular de células hospedeiras de *E. coli* produtoras de Apo2L/TRAIL.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, em que o dito lisado é clarificado antes de carregar na coluna de troca catiônica.

25 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o eluído obtido na etapa (c) é submetido à etapa de cristalização (d) sem purificação adicional.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a coluna de troca catiônica é uma coluna de SP-Sepharose.

30 7. Método, de acordo com a reivindicação 6, em que o pH da mistura carregada na dita coluna é 7,5 ou é ajustado para cerca de 7,5.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6, em que a eluição de Apo2L/TRAIL é realizada em um tampão de eluição que compreende

NaCl 100-200 mM ou Na₂SO₄ em um tampão, ajustando o pH para 7,5-7,8.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que, na etapa (d), o eluído é resfriado de uma temperatura de cerca de 15 a 30°C até uma temperatura de cerca de 2 a 8°C em cerca de uma a 60 horas.

5 10. Método, de acordo com a reivindicação 9, em que, na etapa (d), o eluído é resfriado até uma temperatura de cerca de 2 a 8°C em cerca de uma a 8 horas.

10 11. Método, de acordo com a reivindicação 9, em que, na etapa (d), o eluído é resfriado até uma temperatura de cerca de 2 a 8°C em cerca de uma hora.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que, na etapa (d), o eluído é resfriado até uma temperatura de cerca de 4°C em cerca de uma hora.

15 13. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o pH do eluído é 7,0-8,0 ou é ajustado para 7,0-8,0 antes da cristalização.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, em que o pH do eluído é 7,3 ou é ajustado para 7,3 antes da cristalização.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13, em que o pH do eluído é 7,5-8,0 ou é ajustado para 7,5-8,0 antes da cristalização.

20 16. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que, na etapa (d), a temperatura de cerca de 2 a 4°C é mantida até que a solubilização em equilíbrio seja atingida ou quase atingida.

25 17. Método, de acordo com a reivindicação 16, em que, na etapa (d), a solubilidade de Apo2L/TRAIL é diminuída pela adição de um anti-solvente.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, em que o dito anti-solvente é selecionado no grupo que consiste em um polietilenoglicol (PEG), MPD, etanol, isopropanol, e dioxano.

30 19. Método, de acordo com a reivindicação 18, em que o peso molecular do PEG é entre cerca de 400 e cerca de 10.000 dáltons.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que o peso molecular do PEG é 400, 3.350 ou 10.000 dáltons.

21. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que, na etapa (e), Apo2L/TRAIL é recuperada na forma de cristais separados do licor-mãe por filtração ou centrifugação ou uma combinação delas.

5 22. Método, de acordo com a reivindicação 21, em que o pH do licor-mãe é ajustado para cerca de 8,0 antes da filtração, para diminuir a solubilidade.

10 23. Método, de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda as etapas de dissolver os cristais de Apo2L/TRAIL obtidos na etapa (d) e submeter a solução obtida a uma segunda etapa de purificação cromatográfica.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, em que a dita segunda etapa de purificação cromatográfica é um cromatografia de interação hidrofóbica.

15 25. Método, de acordo com a reivindicação 24, em que a cromatografia de interação hidrofóbica é realizada em uma coluna de Fenil-Sepharose.

26. Método, de acordo com a reivindicação 23, em que a dita segunda etapa de purificação cromatográfica é uma cromatografia de troca catiônica.

20 27. Método, de acordo com a reivindicação 26, em que a dita cromatografia de troca catiônica é realizada em uma coluna de de CM-Sepharose o SP-Sepharose.

25 28. Método, de acordo com a reivindicação 23, em que Apo2L/TRAIL é recuperada e formulada depois da dita segunda etapa de purificação cromatográfica por ultrafiltração/diafiltração.

29. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a dita pureza é de pelo menos cerca de 99,5%.

30. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a dita pureza é de pelo menos cerca de 99,9%.

1 TTTCTCACTACTATAAAGAATAGAGAAGGAGGGCTTCAGTGACCGGCTGCCTGGCTGACTTACAGCAGTCAGACTCTGACAGGATC
 1 ATGGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGACCCAGCCTGGGACAGACCTGGCTGATCGTGATCTTACAGTGTCTCAGTGTCTCTCTGT
 1 MetAlaMetMetGluValGlnGlyProSerLeuGlyGlnThrCysValLeuIleValIlePheThrValLeuLeuGlnSerLeuCys
 181 GTGGCTGTAACCTTACGTGTACTTTACCAAGGAGCTGAAGCAGATGCAGGACAAAGTACTCCAAAAGTGGCATTGGTTGTTTCTTAAAGAA
 31 ValAlaValThrTyrValTyrPheThrAsnGluLeuLysGlnMetGlnAspLysTyrSerLysSerGlyIleAlaCysPyeLeuL6sGlu
 271 GATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAGAGAGTATGAACAGCCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAGCTCGTTAGAAAAG
 61 AspAspSerTyrTrpAspProAsnAspGluSerMetAsnSerProCysTrpGlnValLysTrpGlnLeuArgGlnLeuValArgLys
 361 ATGATTTTGAGAACCTCTGAGGAAACCAATTTCTACAGTTCAAGAAAACCAAAATATTTCTCCCTAGTGAGAGAAAAGAGGTCCNCAG
 91 MetIleLeuArgThrSerGluGlnThrIleSerThrValGlnGlnLysGlnAsnIleSerProLeuValArgGluArgGlyProGln
 451 AGAGTAGCAGCTCACATAAAGTGGACCCAGAGGAAGCAACACATTGTCTTCCAAAACCTCCAAGAATGAAAAGGCTCTGGGCCCGCAAA
 121 ArgValAlaAlaHisIleThrGlyThrArgGlyThrArgSerAsnThrLeuSerSerProAsnSerLysAsnGluLysAlaLeuGlyArgLys
 541 ATAAACTCCTGGGAAATCAICAAAGGAGTGGCAITTCATTCCTGAGCAACTTGGCACTTGAGGAATGGTGAAGTGGTCCATCCATGAAAAAGGG
 151 IleAsnSerTrpGluSerSerArgSerGlyHisSerPheLeuSerAsnLeuHisLeuArgAsnGlyGluLeuValIleHisGluLysGly
 631 TTTTACTACATCTATTCCTCAACATACTTTTCGATTTTCAGGAGGAAATAAAAAGAAAACACAAAAGAACGACAAAACAAATGGTCCAAATATATT
 181 PheTyrTyrIleTyrSerGlnThrTyrPheArgPheGlnGluGluIleLysGluAsnThrLysAsnAspLysGlnMetValGlnTyrIle
 721 TACAAATACACAAGTTATCCTGACCCCTATATTGTTGATGAAAAGTGTAGAAAATAGTTGTTGGTCTAAAAGATGCAGAATATGGACTCTAT
 211 TyrLysTyrThrSerTyrProAspProIleLeuLeuMetLysSerAlaArgAsnSerCysTrpSerLysAspAlaGluTyrGlyLeuTyr
 811 TCCATCTATCAAGGGGGAATATTTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAAATTTTGTGTTCTGTAAACAAATGAGCACTTGATAGACATGGACCAT
 241 SerIleTyrGlnGlyIlePheGluLeuLysGluAsnAspArgIlePheValSerValThrAsnGluHisLeuIleAspMetAspHis
 901 GAAGCCAGTTTTTTCGGGGCCTTTTAGTTGGCTAACTGACCTGGAAAAGAAAAGCAATAACCTCAAAGTACTATTTCAGTTTTTCAGGAT
 271 GluAlaSerPhePheGlyAlaPheLeuValGlyStp
 991 GATACACTATGAAGATGTTTCAAAAAAATCTGACCAAAAACAAAACACAGAAA

FIG. 1

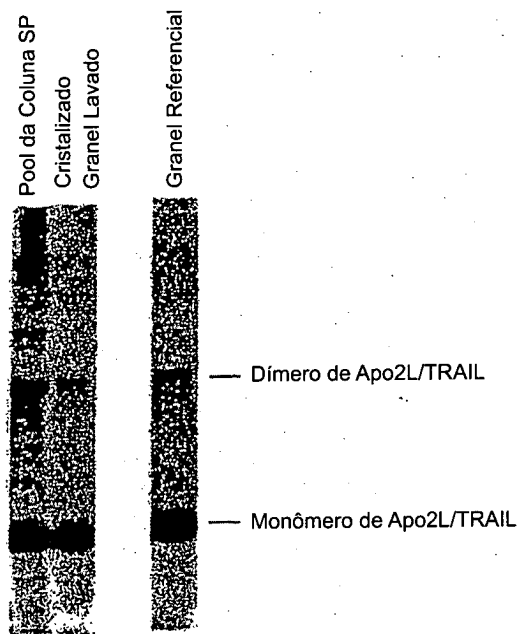


FIG. 2

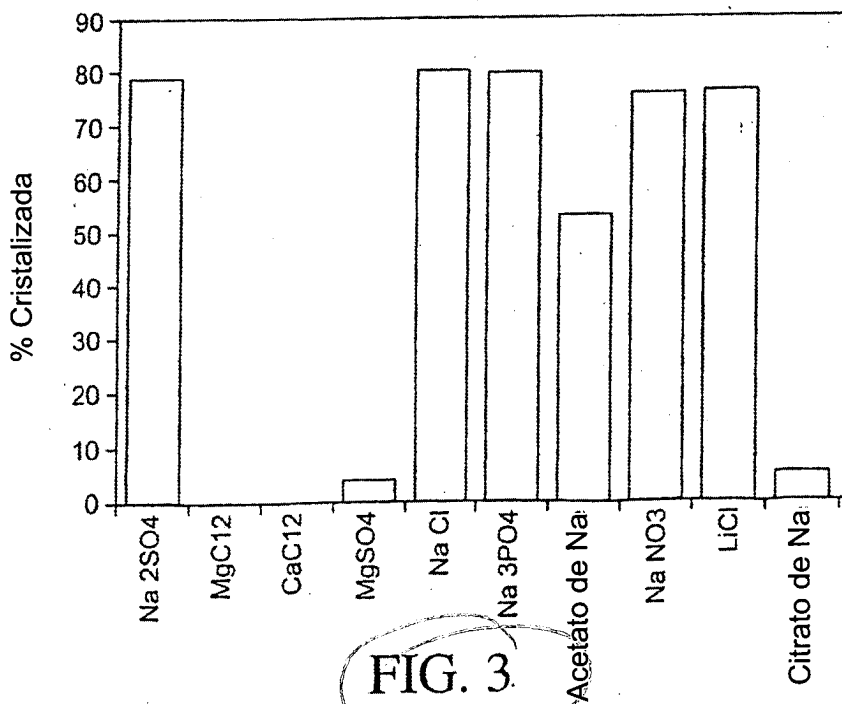


FIG. 3

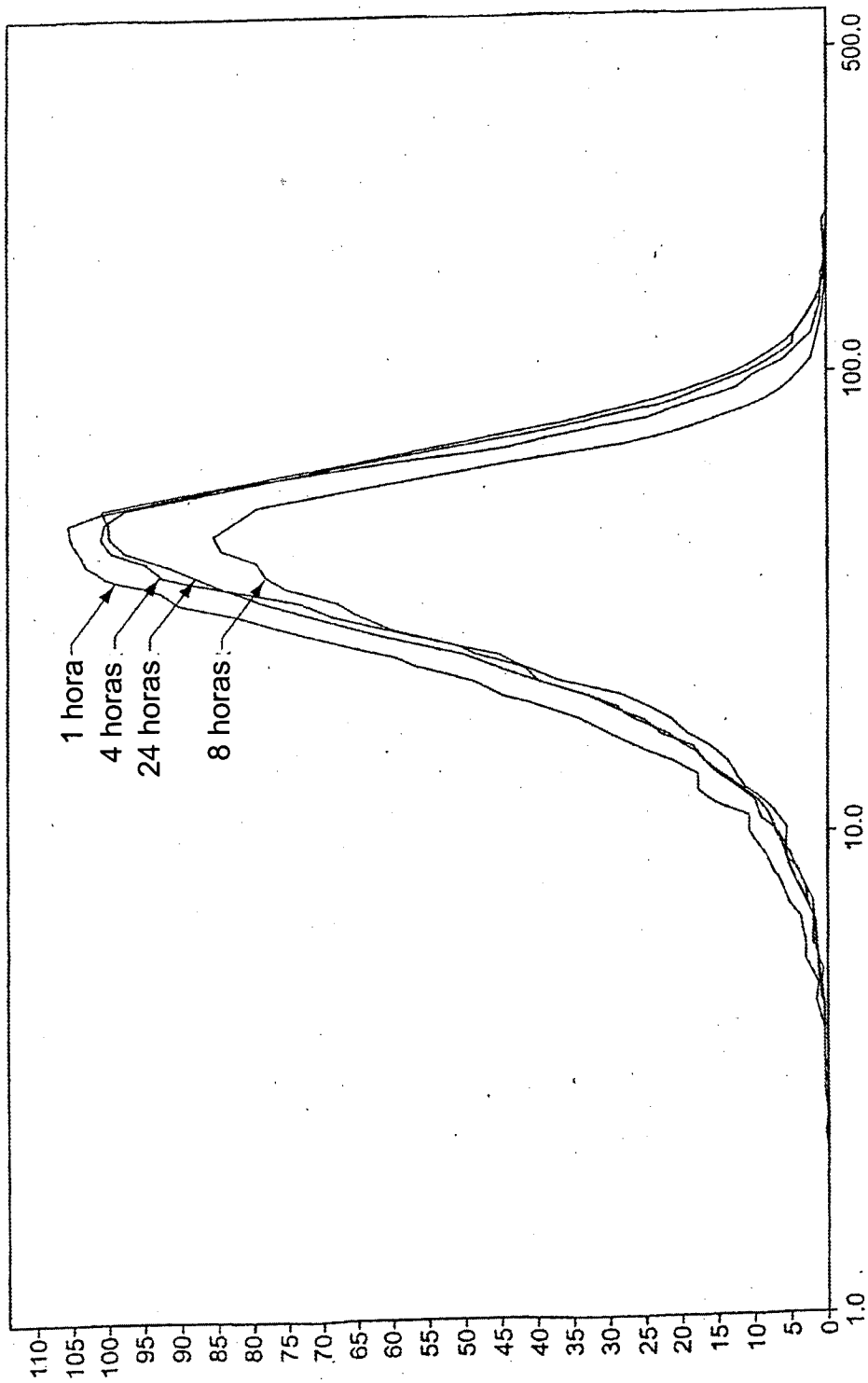


FIG. 4

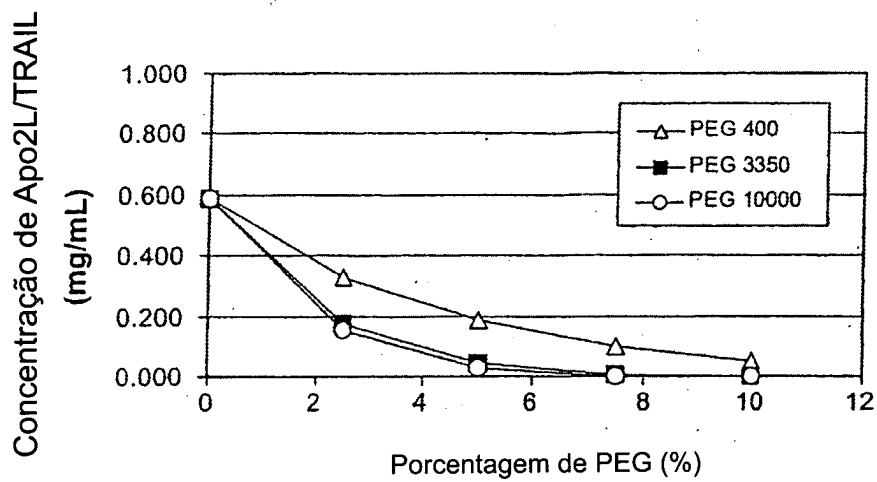


FIG. 5

RESUMO

Patente de Invenção: "FORMULAÇÕES DO LIGANTE APO-2/TRAIL".

A presente invenção refere-se geralmente à purificação de Apo2L/TRAIL, envolvendo cristalização.