



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21 **EXPEDIENTE No**

06-9419

54 **TITULO** POLIPÉPTIDOS CRISTALINOS DEL RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE
NECROSIS DE TUMOR.

51 **CLASIFICACION INTERNACIONAL** C07 14/15, A61K9/14, 9/16 38/19
A63P

71 **SOLICITANTE** AMGEN INC

DOMICILIO WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74 **APODERADO** ALVARO CORREA ORDOÑEZ
TP 20 281

22 **BOGOTA D C** FEBRERO 1, 2006

PETITORIO

000001

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 0000419
Fecha (ANO): 2006-02-01 16:27:46
Folios: 254
Fraseo : 011 PCT-PRIENI 370 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2006 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 2006-03-01

①

SOLICITUD DE :

☒ X
☒ X

Patente de Invención
Capítulo I.

☐
☐

Patente de Modelo de Utilidad
Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: AMGEN INC

Dirección: Law Department, 1201 Amgen Court West, Seattle,
WA 98119-3105 (US).

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Washington, Estados Unidos de
América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6o.

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: patents.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ X NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 79.143.366 TP 20.281

④

INVENTOR (ES)

Nombre: OSSLUND, Timothy, D.; CLOGSTON, Christi, L.; CRAMPTON, Shon, Lee; BASS, Randal, B.

Dirección: 457 Vista Montana, Camarillo, California 93010 Estados Unidos de América; 610 Courtney Court,
Newbury Park, California 91230 Estados Unidos de América; 1710 N. Fuller Avenue, #304, Los
Angeles, California 98136 Estados Unidos de América; 3939 SW Elmgrove Street, Seattle,
Washington 98136 Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE; ESTADOUNIDENSE; ESTADOUNIDENSE;
ESTADOUNIDENSE

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/024738

Fecha Julio 29, 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/012353

Fecha Febrero 10, 2005

⑥

Título (54) POLIPÉPTIDOS CRISTALINOS DEL RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE NECROSIS DE TUMOR.

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 14/715, A61K 9/14, A61K 9/16, A61K 38/19, A61K 37/00

⑧

Prioridad

SI ☒ X NO ☐

(33) País de Origen

60/491,827

(32) Fecha

Agosto 1, 2003

(31) Número de Solicitud

US

⑨

Comprobante de pago No. 05-43,222 Y 05-77,803

Fecha 14-JUN-05 Y 07-OCT-05

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

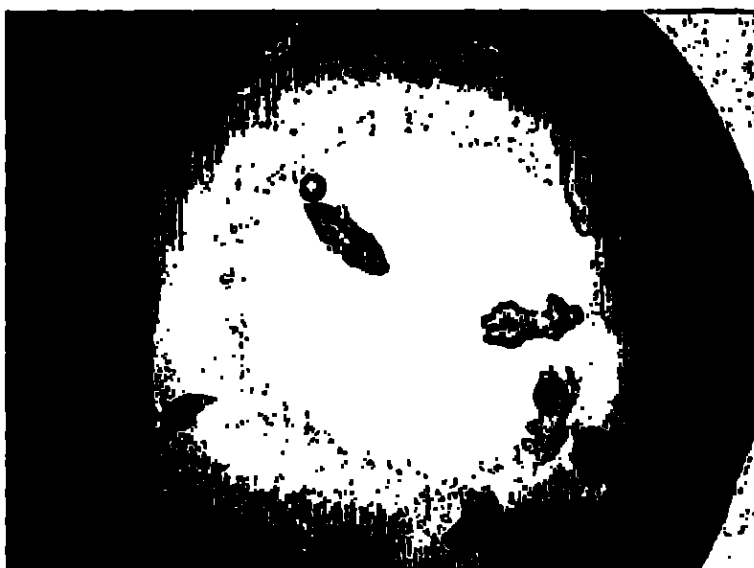
ANEXOS

000002

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Copia Búsqueda y opinión escrita.

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de
Usaquén

T.P. 20.281

000003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

HIT : 620176039-2

SAPEKUNSIKIN T UMBU.LU

Radicación : 06-09419 ~~06-09419~~ Folios: 253

Fecha (MM): 2006-02-01 16:27:48

Transit : 011 PCT-PATENT 3/8 FILE MULT 411 PRESENTAC

Preeminencia: 2000 OCVISION DE NUEVAS OPERACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 43,222
FECHA : JUNIO 14 DE 2005

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CORREA ORDOÑEZ	CONSIGNACION	BANCC POPULAR	050-00110-6	28104071	14/04/2005	139.191.600.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,060.00
		TOTAL :	\$ 443,060.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

POST

000004

ADMINISTRACION Y COMERCIO
Radacion : 06009419 00000000 Folios: 253
Fecha (RND): 2006-02-01 16:27:48
Tramite : 01) PCF-PAIENI 3/8 FASE NNCI 411 PRESENTE:
Dependencia: 2420 DIVISION DE MUJERS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 5 - 77,803
FECHA : OCTUBRE 7 DE 2005

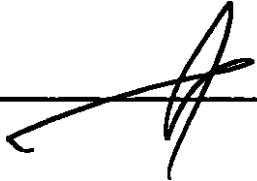
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CORREA ORDOEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	36864733	07/10/2005	99,278,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRANI	20,000.00
		TOTAL :	\$ 20,000.00

SON: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 February 2005 (10.02.2005)

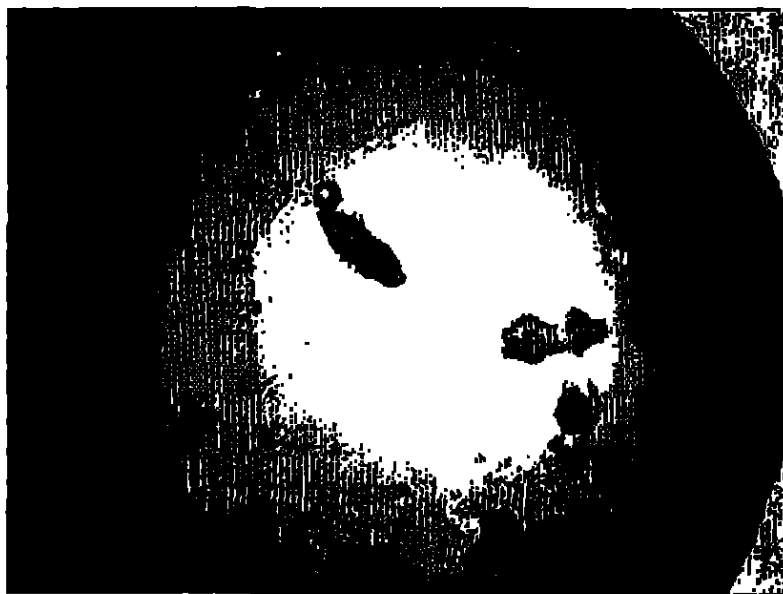
PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/012353 A1

- (51) International Patent Classification: C07K 14/715, A61K 9/14, 9/16 (74) Agent: SPRUNGER, Suzanne, A.; AMGEN INC., Law Department, 1201 Amgen Court West, Seattle, WA 98119-3105 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US2004/024738
- (22) International Filing Date: 29 July 2004 (29.07.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/491,827 1 August 2003 (01.08.2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN INC. [US/US]; Law Department, 1201 Amgen Court West, Seattle, WA 98119-3105 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): OSSLUND, Timothy, D. [US/US]; 457 Vista Montana, Camarillo, CA 93010 (US). CLOGSTON, Christi, L. [US/US]; 610 Courtney Court, Newbury Park, CA 91230 (US). CRAMPTON, Shon, Lee [US/US]; 1710 N. Fuller Avenue, #304, Los Angeles, CA 98136 (US). BASS, Randal, B. [US/US]; 3939 SW Elmgrove Street, Seattle, WA 98136 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: CRYSTALLINE TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR 2 POLYPEPTIDES



(57) Abstract: The present invention relates to crystalline polypeptides and to methods of making them; to pharmaceutical compositions comprising crystalline polypeptides; and to therapeutic uses of such polypeptides and compositions.

WO 2005/012353 A1



Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

CRYSTALLINE TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR 2 POLYPEPTIDES

This application claims the benefit under 35 C.F.R. 119(e) of U.S. provisional application Serial No. 60/491,827, filed August 1, 2003, which is incorporated by reference in its entirety
5 herein.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Many therapeutic molecules are polypeptides, some of which are prone to denaturation, degradation, and/or aggregation. Aggregation of polypeptides is undesirable as it may result in immunogenicity (Cleland *et al.*, 1993, *Crit Rev Therapeutic Drug Carrier Systems*, 10: 307-377; and Robbins *et al.*, 1987, *Diabetes*, 36: 838-845). Polypeptides are also subject to catalysis or conversion into inactive forms by the natural biological processes of the organisms to which they are administered. Further, therapeutic polypeptides may be produced as a heterogeneous mixture of forms, varying in the extent of glycosylation or in other aspects of their three-dimensional
15 conformation.

Crystallization of therapeutic polypeptides provides an advantage in producing a stable and homogenous formulation of such polypeptides. Certain advantages of crystals include greater ease of handling of the therapeutic compound in preparing pharmaceutical products; reduced degradation, denaturation and/or aggregation; the potential for creating a sustained release form of the therapeutic polypeptide to reduce the frequency of dosing; and the ability to use crystalline
20 therapeutic polypeptides to form a pharmaceutical composition having a very high concentration of the therapeutic polypeptide. In addition, crystallization methods can produce a more homogenous population of polypeptides in the formulation, because only the addition of similarly configured polypeptide molecules will add to sustained growth of the crystal – when a limiting amount of polypeptides of variant structure have been incorporated into the crystal lattice, the resulting structural weaknesses in the crystal will prevent its further growth. Since incorporation into a
25 crystalline form can ensure that a greater percentage of the polypeptides will be in an active form, administration of a smaller amount of the crystalline therapeutic peptides can produce a therapeutic effect equivalent to administration of a greater amount of a more heterogeneous polypeptide formulation.

30

Therefore, there is a need for crystalline formulations of therapeutic polypeptides.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides crystalline forms of TNFR2 polypeptides, including crystalline TNFR2:Fc polypeptides and crystalline etanercept. One embodiment of the invention is
35 a crystal of etanercept; in certain embodiments the etanercept crystal is in the form of a rod, and/or

has a maximum length of between 0.5 millimeters and 1.5 millimeters or between 0.05 millimeters and 0.3 millimeters.

Also provided by the invention are methods of making crystals of TNFR2 polypeptides such as an TNFR2-Ig fusion polypeptide or etanercept. In certain embodiments, the TNFR2 polypeptides are monomers; in additional embodiments, the TNFR2 polypeptides are multimers such as dimers, trimers, or oligomers. In further embodiments, the TNFR2 polypeptide shares at least 90% amino acid identity across the length of amino acids 39 through 162 of SEQ ID NO:1.

The present invention also relates to the use of the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, such as crystalline TNFR2:Fc polypeptides or crystalline etanercept, in the manufacture of a medicament for the prevention or therapeutic treatment of each medical disorder disclosed herein.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a photograph of etanercept crystals formed from a polypeptide solution containing 50.96 mg of etanercept per milliliter, as described further in Example 1 below. The crystallization reservoir buffer was 0.1M HEPES pH 7.0, 30% PEG 6000, 0.7M lithium chloride; after seven days at ambient room temperature the crystals were harvested manually, extensively washed in the above reservoir buffer, and the photograph was taken. Crystals from this group were submitted for N-terminal amino acid sequence analysis.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention is directed to TNFR2 polypeptides in crystalline form, and to methods for making and using such crystalline TNFR2 polypeptides. These polypeptide crystals are advantageous in that crystalline polypeptides can be stored for longer periods and can exhibit greater physical stability and retention of biological activity, under a wider range of storage and handling conditions, than polypeptides not in crystalline form.

Definitions

"Polypeptide" is defined herein as natural, synthetic, and recombinant proteins or peptides generally having more than 10 amino acids. A "polypeptide linker" can be a polypeptide formed by a series of amino acids as short as one amino acid in length.

"Isolated", as used herein, refers to a polypeptide or other molecule that has been removed from the environment in which it naturally occurs.

"Substantially purified", as used herein, refers to a polypeptide that is substantially free of other polypeptides present in the environment in which it naturally occurs or in which it was

produced; a preparation of a polypeptide that has been substantially purified contains at least 90% by weight (or at least 95%, at least 98%, or at least 99% by weight) of that polypeptide, wherein the weight of the polypeptide includes any carbohydrates, lipid, or other residues covalently attached to the polypeptide. A substantially purified polypeptide preparation may contain variation
5 among polypeptide molecules within the preparation, with respect to extent and type of glycosylation or other post-translation modification, or with respect to conformation or extent of multimerization.

"Purified polypeptide", as used herein, refers to an essentially homogenous polypeptide preparation; however, an essentially homogenous polypeptide preparation may contain variation
10 among polypeptide molecules within the preparation, with respect to extent and type of glycosylation or other post-translation modification, or with respect to conformation or extent of multimerization.

"Full-length" polypeptides are those having the complete primary amino acid sequence of the polypeptide as initially translated; for example, the full-length form of the human TNFR2 is shown as SEQ ID NO:1. The "mature form" of a polypeptide refers to a polypeptide that has
15 undergone post-translational processing steps such as cleavage of the signal sequence or proteolytic cleavage to remove a prodomain. Multiple mature forms of a particular full-length polypeptide may be produced, for example by cleavage of the signal sequence at multiple sites, or by differential regulation of proteases that cleave the polypeptide. The mature form(s) of such polypeptide can be obtained by expression, in a suitable mammalian cell or other host cell, of a
20 nucleic acid molecule that encodes the full-length polypeptide. The sequence of the mature form of the polypeptide may also be determinable from the amino acid sequence of the full-length form, through identification of signal sequences or protease cleavage sites. In certain embodiments, the mature form of the human TNFR2 polypeptide has an N-terminal amino acid residue selected from
25 the group consisting of amino acids 23, 27, and 28 of SEQ ID NO:1, or an N-terminal amino acid selected from the group consisting of each amino acid between amino acid 1 and amino acid 39 of SEQ ID NO:1.

The "percent identity" of two amino sequences can be determined by visual inspection and mathematical calculation, and the comparison can also be done by comparing sequence information
30 using a computer program. The first step in determining percent identity is aligning the amino acid sequences to so as to maximize overlap and identities, while minimizing gaps in the alignment. The second step in determining percent identity is calculation of the number of identities between the aligned sequences, divided by the total number of amino acids in the alignment. When determining the percent identity that an amino acid sequence has "across the length of" a target
35 amino acid sequence, the length of the target amino acid sequence is the minimum value for the number of total bases in the alignment. For example, when determining the percent identity of a first amino acid sequence of 50 amino acids "across the length of" a second amino acid sequence of amino acids 1 through 100 of SEQ ID NO:X, if the first amino acid sequence is identical to amino

acids 1 through 50 of SEQ ID NO:X, the percent identity would be 50%: 50 amino acid identities divided by the total length of the alignment (100 amino acids). An exemplary computer program for aligning amino acid sequences and computing percent identity is the BLASTP program available for use via the National Library of Medicine website ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi, or the UW-BLAST 2.0 algorithm. Standard default parameter settings for UW-BLAST 2.0 are described at the following Internet site: sapient.wustl.edu/blast/blast/README.html. In addition, the BLAST algorithm uses the BLOSUM62 amino acid scoring matrix, and optional parameters that can be used are as follows: (A) inclusion of a filter to mask segments of the query sequence that have low compositional complexity (as determined by the SEG program of Wootton and Federhen (Computers and Chemistry, 1993); also see Wootton and Federhen, 1996, Analysis of compositionally biased regions in sequence databases, *Methods Enzymol.* 266: 554-71) or segments consisting of short-periodicity internal repeats (as determined by the XNU program of Claverie and States (Computers and Chemistry, 1993)), and (B) a statistical significance threshold for reporting matches against database sequences, or E-score (the expected probability of matches being found merely by chance, according to the stochastic model of Karlin and Altschul (1990); if the statistical significance ascribed to a match is greater than this E-score threshold, the match will not be reported.); E-score threshold values are 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001, 1e-5, 1e-10, 1e-15, 1e-20, 1e-25, 1e-30, 1e-40, 1e-50, 1e-75, or 1e-100. Other programs used by those skilled in the art of sequence comparison can also be used to align amino acid sequences, such as, the Genetics Computer Group (GCG; Madison, WI) Wisconsin package version 10.0 program, 'GAP' (Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acids Res.* 12: 387). The default parameters for the 'GAP' program include: (1) The GCG implementation of a unary comparison matrix (containing a value of 1 for identities and 0 for non-identities) for nucleotides, and the weighted amino acid comparison matrix of Gribackov and Burgess, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, as described by Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas of Polypeptide Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; or other comparable comparison matrices; (2) a penalty of 30 for each gap and an additional penalty of 1 for each symbol in each gap for amino acid sequences, or penalty of 50 for each gap and an additional penalty of 3 for each symbol in each gap for nucleotide sequences; (3) no penalty for end gaps; and (4) no maximum penalty for long gaps.

"Soluble forms" of TNFR2 polypeptides of the invention comprise certain fragments or domains of these polypeptides. Soluble polypeptides are polypeptides that are capable of being secreted from the cells in which they are expressed. A secreted soluble polypeptide can be identified (and distinguished from its non-soluble membrane-bound counterparts) by separating intact cells which express the desired polypeptide from the culture medium, e.g., by centrifugation, and assaying the medium (supernatant) for the presence of the desired polypeptide. The presence of the desired polypeptide in the medium indicates that the polypeptide was secreted from the cells and thus is a soluble form of the polypeptide. The use of soluble forms of cytokine polypeptides of the invention is advantageous for many applications. Purification of the polypeptides from

recombinant host cells is facilitated, since the soluble polypeptides are secreted from the cells. Moreover, soluble polypeptides are generally more suitable than membrane-bound forms for parenteral administration and for many enzymatic procedures. In certain embodiments of the invention, mature soluble forms of TNFR2 polypeptides do not contain a transmembrane or membrane-anchoring domain such as amino acids 258 through 87 of SEQ ID NO:1, or contain an insufficient portion of such a domain (e.g. 10 amino acids or fewer) to result in retention of the polypeptide in a membrane-bound form.

"An isolated polypeptide consisting essentially of an amino acid sequence" means that the polypeptide can optionally have, in addition to said amino acid sequence, additional material covalently linked to either or both ends of the polypeptide, said additional material between 1 and 10,000 additional amino acids covalently linked to either or both ends of the polypeptide; or between 1 and 1,000 additional amino acids covalently linked to either or both ends of the polypeptide; or between 1 and 100 additional amino acids covalently linked to either or both ends of the polypeptide. Covalent linkage of additional amino acids to either or both ends of the polypeptide according to the invention results in a combined amino acid sequence that is not naturally occurring.

TNFR2 Polypeptides for Crystallization

TNFR2 polypeptides are polypeptides that comprise at least a portion of a TNFR2 (tumor necrosis factor receptor 2) polypeptide, or at least a portion of a variant thereof. TNFR2 polypeptides include TNFR2 fusion polypeptides, such as the TNFR2-Ig fusion polypeptides described below, as well as TNFR2:Fc polypeptides, etanercept, and variants, monomeric or multimeric forms, modified versions, and conjugates thereof.

The TNFR2 polypeptide has also been called TNFRSF1B (tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B), p75, and CD120b; the full-length amino acid sequence of TNFR2 polypeptide is shown in SEQ ID NO:1 (see also Swiss-Prot Database Accession Number P20333). Another related but distinct tumor necrosis factor receptor is TNFR1, also called TNFRSF1A and p55 (see also Swiss-Prot Database Accession Number P19438). TNFR2 and TNFR1 are known to bind the pleiotropic cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha or simply "TNF"), which is associated with inflammation. In addition to binding TNF-alpha, the TNFR2 and TNFR1 polypeptides mediate the binding to cells of homotrimers of TNF-beta (more commonly called "lymphotoxin-alpha", or LT-alpha), which is another cytokine associated with inflammation and which shares structural similarities with TNF-alpha (e.g., see Cosman, *Blood Cell Biochem* 7:51-77, 1996). As used herein, "TNFR" or "TNFR polypeptide" refers to a polypeptide that is capable of binding TNF-alpha or LT-alpha; specific examples of TNFR polypeptides are TNFR2 and TNFR1. As used herein, "binding", or "ligand binding", or "having ligand-binding activity" means binding a ligand such as TNF-alpha or LT-alpha with an affinity (that is, with an inhibition constant

or K_d) of at least $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ when in a monomeric form, or in further embodiments, with an affinity of at least $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ when in a monomeric form, or with an affinity of at least $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ when in the form of a multimer such as a dimer or trimer, or with an affinity of at least $8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ when in the form of a multimer such as a dimer or trimer. The TNF-alpha-binding affinity (inhibition constant) of a TNFR2 polypeptide or a variant thereof can be determined using a binding assay such as that described in Example 6 below (see also Mohler *et al.*, 1993, *J Immunol* 151: 1548-1561 and Peppel *et al.*, 1991, *J Exp Med* 174: 1483-1489). Similarly, analogous assays can be used to determine the binding affinity of a TNFR2 polypeptide or a variant thereof for LT-alpha or any other potential ligand. "TNFR-related", as used herein, refers to polypeptides that are related by amino acid sequence similarity or three-dimensional structural similarity to TNFR polypeptides, but which do not necessarily bind TNF-alpha or LT-alpha. Examples of TNFR-related polypeptides are CD40 (Swiss-Prot Database Accession Number P25942) and OX40 (Swiss-Prot Database Accession Number P43489) polypeptides.

The three-dimensional structures for TNFR1 and for some TNFR-related polypeptides have been determined; for example, the extracellular domain of the p55 TNFR1 has been crystallized and submitted to the Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org/pdb/) under the accession number 1EXT, and the p55 TNFR1 polypeptide in association with its ligand LT-alpha has been submitted to PDB as 1TNR. Also, in the Structural Classification of Proteins resource (SCOP, scop.berkeley.edu) the TNFR and TNFR-related polypeptides defining the SCOP TNF Receptor-Like protein fold are related structurally in that they share an extracellular domain having at least three similar disulphide-rich domains. For example, TNFR2 as shown in SEQ ID NO:1, has four such domains, with the most N-terminal three domains sharing a characteristic pattern of conserved cysteine residues that are involved in disulphide bond formation. The four disulphide-rich domains are at amino acids 39 through 76, at amino acids 77 through 118, at amino acids 119 through 162, and at amino acids 163 through 201 of SEQ ID NO:1. The disulphide bonds are formed between the pairs of cysteine residues at the following amino acid positions: 40 and 53, 54 and 67, 57 and 75, 78 and 93, 96 and 110, 100 and 118, 120 and 126, 134 and 143, 137 and 161, and (in the fourth domain) 164 and 179; the fourth disulfide bond domain also contains another pair of cysteine residues at amino acids 184 and 200 of SEQ ID NO:1.

TNFR2 polypeptides and variants thereof can be analyzed for their three-dimensional similarity to structurally characterized TNFR polypeptides and TNFR-related polypeptides by using computer programs such as GeneFold (Tripos, Inc., St. Louis, MO; Jaroszowski *et al.*, 1998, *Prot Sci* 7: 1431-1440), a protein threading program that overlays a query protein sequence onto structural representatives within the Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000, *Nucleic Acids Res* 28: 235-242). To use GeneFold to assess the structure of a TNFR2 polypeptide or a variant thereof, the polypeptide sequence is entered into the program, which assigns a probability score that reflects how well it folds onto known protein structures ("template" structures) that are present in the GeneFold database. For scoring, GeneFold relies on primary amino acid sequence

similarity, burial patterns of residues, local interactions, and secondary structure comparisons. The GeneFold program folds (or threads) the amino acid sequence onto all of the template structures in a database of protein folds, which includes the solved structures for several human TNFR polypeptides such as p55 TNFR1 (the template "1tnrR") and also the TNFR-related polypeptide CD40 (the template "1cdf_"). For each comparison, three different scores are calculated, based on (i) sequence only; (ii) sequence plus local conformation preferences plus burial terms; and (iii) sequence plus local conformation preferences plus burial terms plus secondary structure. In each instance, the program determines the optimal alignment, calculates the probability (P-value) that this degree of alignment occurred by chance, and reports the inverse of the P-value as the score. These scores therefore reflect the degree to which the query polypeptide sequence matches the various reference structures such as TNFR polypeptide structures. When using GeneFold to compare a TNFR2 polypeptide or variant thereof (the query polypeptide) to other TNFR or TNFR-related polypeptides, the query polypeptide will be matched to the 1cdf_, the 1tnrR, or another TNFR or TNFR-related template as the highest hit in one of the three scoring categories, and/or will be matched to a TNFR template with any score of at least 500, or at least 700, or at least 900, or at least 990, or 999.9 (the maximum score). Another method for analysis of a TNFR2 polypeptide or a variant thereof is alignment of the structure of that query polypeptide with those of TNFR or TNFR-related proteins through the well known process of homology modeling. One useful software program that can be used for homology modeling is the 'Modeler' program available from Accelrys, a subsidiary of Pharmacia Inc. (Princeton, NJ).

The TNFR2 polypeptide for crystallization comprises at least a portion of the extracellular region of the TNFR2 polypeptide of SEQ ID NO:1, or a variant thereof. In certain embodiments, the entire extracellular region of the TNFR2 polypeptide is included in the TNFR2 polypeptide. As certain examples, the TNFR2 polypeptide can comprise amino acids 28 through 257, or amino acids 27 through 257, or amino acids 23 through 257 of SEQ ID NO:1. In further embodiments, the extracellular region of the TNFR2 polypeptide is truncated to delete at least one potential N-linked glycosylation site (e.g. amino acids 171 and 193 of SEQ ID NO:1) and/or a proline-rich region (e.g. amino acids 24 through 36 of SEQ ID NO:1 or amino acids 217 through 261 of SEQ ID NO:1) while leaving intact the three most N-terminal domains having intramolecular disulfide bridges. For example, in one embodiment, the TNFR2 polypeptide comprises amino acids 39 through 162 of SEQ ID NO:1, or amino acids 39 through 179 of SEQ ID NO:1, or amino acids 39 through 200 of SEQ ID NO:1, or a variant of any of the foregoing.

TNFR2 polypeptides for crystallization according to the present invention include polypeptides with amino acid sequence lengths that are at least 20% (or at least 25%, or at least 30%, or at least 35%, or at least 40%, or at least 50%) of the length of the TNFR2 polypeptide of SEQ ID NO:1 and have at least 60% sequence identity (or at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97.5%, at least 99%, or at least 99.5%) with that TNFR2 polypeptide. Also included in the present invention are TNFR2 polypeptides and

polypeptide fragments that contain a segment comprising at least 80, or at least 90, or at least 100, or at least 110, or at least 120, or at least 130 contiguous amino acids of SEQ ID NO:1, or a variant thereof. Such polypeptides and polypeptide fragments may also contain a segment that shares at least 70% sequence identity (or at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%,
 5 at least 95%, at least 97.5%, at least 99%, or at least 99.5%) with the TNFR2 polypeptide of SEQ ID NO:1.

When making such variants of the TNFR2 polypeptides to be crystallized, several considerations can be used to guide those of skill in the art in making variants that retain biological activity such as TNF-alpha-binding activity. In certain embodiments, it will be desirable to retain
 10 at least the three N-terminal disulfide bond regions, or at least all four of the disulfide bond regions described above for the TNFR2 polypeptide of SEQ ID NO:1. Further, portions of the TNFR2 extracellular domain that encompass the N-terminal three disulfide bond regions can be extended to include all or a portion of the fourth disulfide bond region, and in particular embodiments none of the cysteines of the fourth disulfide bond region are included, or a region of the fourth disulfide
 15 bond region including the first pair of cysteines (at amino acids 164 and 179 of SEQ ID NO:1) is included, and/or a region of the fourth disulfide bond region including the second pair of cysteines (at amino acids 185 and 200 of SEQ ID NO:1) is included. Therefore, variants encompassed within the scope of the invention retain the cysteine residues involved in forming the disulfide bonds of these domains, and also retain the approximate spacing (i.e. number of residues of the
 20 primary amino acid sequence) between those cysteines. For example, variants that do not insert or delete more than five amino acids between cysteine pairs that form disulfide bonds are within the scope of the invention, as are variants that do not insert or delete more than four amino acids between such cysteines, and variants that do not insert or delete more than three amino acids between such cysteines, and variants that do not insert or delete more than two amino acids
 25 between such cysteines, and variants that do not insert or delete more than one amino acid between such cysteines.

Another consideration that will guide those of skill in the art in making variants of TNFR2 polypeptides is the nature of the amino acid substitutions that are made; such substitutions can be conservative, which means that the amino acid present in the variant at a certain position has the
 30 same chemical and/or size properties as the amino acid at the corresponding position in the unaltered TNFR2 polypeptide. Table 2 summarizes groups of amino acids that are considered to have similar properties, so that the substitution of any amino acid with another from the same row of Table 2 would be a conservative substitution. In certain embodiments, TNFR2 polypeptide variants have 20% or fewer amino acid substitutions (or 15% or fewer, or 10% or fewer, or 7.5%
 35 or fewer, or 5% or fewer, or 2.5% or fewer, or 1% or fewer) across the length of amino acids 39 through 162 of SEQ ID NO:1, or of amino acids 39 through 179 of SEQ ID NO:1, or of amino acids 39 through 200 of SEQ ID NO:1. In certain embodiments, TNFR2 polypeptide variants have 20% or fewer conservative amino acid substitutions (or 15% or fewer, or 10% or fewer, or 7.5% or

fewer, or 5% or fewer, or 2.5% or fewer, or 1% or fewer) across the length of amino acids 39 through 162 of SEQ ID NO:1, or of amino acids 39 through 179 of SEQ ID NO:1, or of amino acids 39 through 200 of SEQ ID NO:1.

In certain embodiments, the TNFR2 polypeptides or variants thereof to be crystallized have TNF-alpha-binding activity, and/or LT-alpha-binding activity.

Table 2
Conservative Amino Acid Substitutions

Basic:	arginine; lysine; histidine
Acidic:	glutamic acid; aspartic acid
Polar:	glutamine; asparagine
Hydrophobic:	leucine; isoleucine; valine
Aromatic:	phenylalanine; tryptophan; tyrosine
Small:	glycine; alanine; serine; threonine; methionine

10 **TNFR2 Fusion Proteins**

In certain embodiments, the TNFR2 polypeptides to be used in the crystallization methods of the invention include TNFR2 polypeptides fused to a portion of an Ig (immunoglobulin) polypeptide, or to a variant thereof, optionally with a polypeptide linker between the TNFR2 portion and the Ig portion of the TNFR2-Ig fusion polypeptide. (The optional polypeptide linker can be as short as one amino acid in length, when it is present in a TNFR2 fusion polypeptide.) Immunoglobulin (Ig) polypeptides are related by amino acid sequence and also by three-dimensional structure. The Ig superfamily of polypeptides, as defined in SCOP, is one subset of proteins having the protein fold "immunoglobulin-like beta-sandwich", which is described as generally having seven strands arranged in two sheets, although some members of the fold have additional strands. The Ig superfamily is subdivided into four families of protein domains: the V set domains (antibody variable domain-like); the C1 set domains (antibody constant domain-like); the C2 set domains; and the I set domains

A TNFR2-Ig fusion polypeptide comprises at least a portion of an Ig polypeptide, for example, at least 10 contiguous amino acids of a constant region of an Ig polypeptide, or a polypeptide at least 14 amino acids in length that shares at least 70% amino acid identity with at least 20 contiguous amino acids of a constant region of an Ig polypeptide. A TNFR2-Ig fusion polypeptide of the present invention can preferably comprise at least one heavy chain constant region and, in certain embodiments, at least one light chain constant region.

In certain embodiments, the Ig polypeptide comprises the constant region of an IgG class heavy chain or a fragment and/or variant thereof, and in other embodiments the constant region of other immunoglobulin isotypes can be used to generate such TNFR2-Ig fusions. For example, a

TNFR2-Ig fusion polypeptide comprising the constant region of an IgM class heavy chain or a fragment and/or variant thereof could be used to generate a decavalent form of the TNFR2-Ig fusion polypeptide. The constant region of immunoglobulin heavy chains, with a specific example of a human IgG1 class heavy chain constant domain provided by SEQ ID NO:2, comprises a CH1 domain (amino acids 1 through 98 of SEQ ID NO:2), a hinge region (amino acids 99 through 110 of SEQ ID NO:2), a CH2 domain (amino acids 111 through 223 of SEQ ID NO:2), and a CH3 domain (amino acids 224 through 330 of SEQ ID NO:2). SEQ ID NO:3 provides a specific example of a variant of an IgG1 class heavy chain constant domain, in which two amino acid substitutions have been made (Glu has been substituted for Asp at position 239, and Met has been substituted for Leu at position 241). Certain embodiments of the invention include TNFR2-Ig fusion polypeptides comprising all or a portion of the extracellular domain of TNFR2 polypeptide (SEQ ID NO:1) fused to all or a portion of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, optionally with a linker polypeptide between the TNFR2 portion and the Ig portion of the TNFR2-Ig fusion polypeptide. In further embodiments of the invention, a heavy chain constant region comprising at least a portion of CH₁ is the Ig portion of a TNFR2-Ig fusion polypeptide. Certain embodiments can also include, for example, the C-terminal half of the hinge region to provide a disulfide bridge between heavy chains. In certain embodiments of this invention, the TNFR2 polypeptide is covalently linked, optionally through a polypeptide linker, to the N-terminus of at least one portion of a CH₁ region of a heavy chain constant domain to form a TNFR2-Ig fusion polypeptide.

In certain additional embodiments, at least a portion of the hinge region is attached to the CH₁ region. As one example, CH₁ and CH₂ are present in the molecule, and the entire hinge region is also present. As another example CH₁ is present along with the first seven amino acids of the hinge (amino acids 99 through 105 of SEQ ID NO:2 or 3). It will be understood by one skilled in the art that the TNFR2-Ig fusion polypeptides of the invention can be, for example, monomeric or dimeric, and that if a dimeric TNFR2-Ig fusion polypeptide is desired, it is important to include the portion of the hinge region implicated in disulfide bond formation between the heavy chains (for example, a portion of amino acids 99 through 110 of SEQ ID NO:2 or 3 that includes amino acid 109 of SEQ ID NO:2 or 3). In further embodiments of the invention, the TNFR2-Ig fusion polypeptide can comprise portions of the CH3 domain that do not include the C-terminal lysine residue (amino acid 330 of SEQ ID NO:2 or 3), as this residue has been observed to be removed in post-translational processing of Ig heavy chain polypeptides.

Fc domain

As used herein, an Fc domain can contain one or all of the heavy chain CH₁, hinge, CH₂, and CH₃ domains described above, or fragments or variants thereof, and can be monomeric, dimeric, or multimeric as determined by the constituents of the TNFR2-Ig fusion polypeptide comprising the Fc domain.

Certain polypeptides specifically contemplated for crystallization according to the invention include TNFR2-Ig fusion polypeptides comprising at least a portion of an Fc domain. A preferred TNFR2 polypeptide suitable for treating diseases in humans and other mammals is TNFR2:Fc, which is used herein to refer to all or a portion of the extracellular domain of a TNFR2 polypeptide or a variant thereof, fused to the Fc portion of an immunoglobulin polypeptide, optionally with a polypeptide linker between the TNFR2 portion and the Fc portion of the TNFR2:Fc polypeptide.

Other multimerizing domains

Multimers of the invention include TNFR2 polypeptides for crystallization, wherein the TNFR2 polypeptides are in dimeric, trimeric, decameric, or other multimeric form. Another method for preparing the multimers of the invention involves use of a leucine zipper. Leucine zipper domains are peptides that promote oligomerization of the polypeptides in which they are found. Leucine zippers were originally identified in several DNA-binding polypeptides (Landschulz et al., *Science* 240:1759, 1988), and have since been found in a variety of different polypeptides. Among the known leucine zippers are naturally occurring peptides and derivatives thereof that dimerize or trimerize. The zipper domain (also referred to herein as a multimerizing, or multimer-forming, domain) comprises a repetitive heptad repeat, often with four or five leucine residues interspersed with other amino acids. Use of leucine zippers and preparation of multimers using leucine zippers are well known in the art. Other multimerization domains include the trimerization domain found in lung surfactant D protein (Kovacs et al., 2002, *J Biomol NMR* 24 : 89-102) and other such domains known in the art.

Etanercept

In one embodiment, the TNFR2 polypeptide that is crystallized is "etanercept," which is a dimer of two polypeptides each consisting of 235 amino acids derived from the extracellular portion of the TNFR2 polypeptide, fused to a 232 amino acid portion of human IgG1. The amino acid sequence of the monomeric component of etanercept is shown as SEQ ID NO:4. In the dimeric form of this molecule, two of these fusion polypeptides (or "monomers") are held together by three disulfide bonds that form between the immunoglobulin portions of the two monomers. The etanercept dimer therefore consists of 934 amino acids, and has an apparent molecular weight of approximately 150 kilodaltons (Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc., pp. 1752-1755). Etanercept is currently sold under the trade name ENBREL® (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA).

Glycosylation and Conjugates

The invention includes TNFR2 polypeptides of the invention with or without associated native-pattern glycosylation. Polypeptides expressed in yeast or mammalian expression systems (e.g., COS-1 or CHO cells) can be similar to or significantly different from a native human polypeptide in molecular weight and glycosylation pattern, depending upon the choice of expression system. Expression of polypeptides of the invention in bacterial expression systems, such as *E. coli*, provides non-glycosylated molecules. Further, a given preparation can include multiple differentially glycosylated species of the polypeptide. Glycosyl groups can be removed through conventional methods, in particular those utilizing glycopeptidase. In general, glycosylated polypeptides of the invention can be incubated with a molar excess of glycopeptidase (Boehringer Mannheim).

A TNFR2 polypeptide for crystallization and use in the therapies described herein may be conjugated with polyethylene glycol (pegylated) to prolong its serum half-life or to enhance protein delivery. An example of a pegylated TNFR polypeptide derived from TNFR p55 is recombinant polyethylene glycol conjugated soluble TNFR p55 (PEG-sTNFR type I), which contains the extracellular domain of TNFR p55; TNFR2 polypeptides and fragments thereof can be conjugated with polyethylene glycol in a similar fashion. Reagents and methods for pegylation of polypeptides are described, for example, in WO 92/16221; WO 99/102330; and U.S. Pat. Nos. 6,420,339; 6,433,158; 6,441,136; 6,451,986; 6,548,644; and 6,552,170; all of which are incorporated by reference herein.

The invention also encompasses crystalline forms of TNFR2 polypeptides conjugated to a cytotoxic or luminescent substance. Such substances include: maytansine derivatives (such as DM1); enterotoxins (such as a Staphylococcal enterotoxins); other toxic proteins and compounds (such as Ricin-A, Pseudomonas toxin, Diphtheria toxin, daunorubicin, doxorubicin, methotrexate, and Mitomycin C); iodine isotopes (such as iodine-125); technetium isotopes (such as Tc-99m); other isotopes (^{212}Bi , ^{131}I , ^{186}Re , and ^{90}Y); cyanine fluorochromes (such as Cy5.5.18); and ribosome-inactivating polypeptides (such as bouganin, gelonin, or saporin-S6).

Producing and Purifying Polypeptides for Crystallization

The TNFR2 polypeptide can be produced by living host cells that express the polypeptide, such as host cells that have been genetically engineered to produce the polypeptide. Methods of genetically engineering cells to produce polypeptides are well known in the art. See, e.g., Ausubel et al., eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York). Such methods include introducing nucleic acids that encode and allow expression of the polypeptide into living host cells. These host cells can be bacterial cells, fungal cells, insect cells, or animal cells grown in culture. Bacterial host cells include, but are not limited to, *Escherichia coli* cells. Examples of suitable *E. coli* strains include: HB101, DH5 α , GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, and any *E. coli* strain that fails to cleave foreign DNA. Fungal host cells that can be used include, but are not limited to, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Aspergillus* cells. A few

examples of animal cell lines that can be used are CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, and WI38. New animal cell lines can be established using methods well known by those skilled in the art (e.g., by transformation, viral infection, and/or selection). Optionally, the polypeptide can be secreted by the host cells into the medium.

5 Purification of the expressed TNFR2 polypeptide can be performed by any standard method. When the TNFR2 polypeptide is produced intracellularly, the particulate debris is removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. When the polypeptide is secreted into the medium, supernatants from such expression systems can be first concentrated using standard polypeptide concentration filters. Protease inhibitors can also be added to inhibit proteolysis and
10 antibiotics can be included to prevent the growth of microorganisms. TNFR2 polypeptides can be produced in the presence of chaperone or accessory proteins in order to obtain a desired polypeptide conformation, or can be subjected to conditions such as oxidizing and/or reducing conditions after production in order to induce refolding or changes in polypeptide conformation (see, for example, WO 02/068455).

15 The TNFR2 polypeptide can be purified using, for example, hydroxypatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, and affinity chromatography, and any combination of purification techniques known or yet to be discovered. For example, protein A can be used to purify TNFR2-Ig polypeptides that are based on human gamma 1, gamma 2, or gamma 4 heavy chains (Lindmark et al., 1983, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13), where the Ig portion of the TNFR2-Ig
20 fusion polypeptide contains the portion of the constant domain involved in binding to protein A. Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human gamma 3 (Guss et al., 1986, *EMBO J.* 5:1567-1575). Other techniques for TNFR2 polypeptide purification can be utilized, depending on need, including but not limited to fractionation on an ion-exchange column, precipitation with ethanol or other alcohols, reverse phase HPLC, FPLC, chromatography on silica,
25 chromatography on heparin SEPHAROSE™, chromatography on an anion or cation exchange resin (such as a polyaspartic acid column), hydrophobic interaction chromatography, chromatofocusing, SDS-PAGE, and ammonium sulfate precipitation can also be utilized depending on need.

30 Production of Crystals, Crystal Formulations, and Compositions:

Polypeptide crystals are grown by controlled crystallization of polypeptides from aqueous solutions or from aqueous solutions containing organic solvents or additives. Solution conditions that may be controlled include, for example, the rate of evaporation of solvent, organic solvents or additives, the presence of appropriate co-solutes and buffers, pH, and temperature. A
35 comprehensive review of the various factors affecting the crystallization of proteins has been published by McPherson, 1985, *Methods Enzymol* 114: 112-120. In addition, McPherson and Gilliland, 1988, *J Crystal Growth*, 90: 51-59 have compiled comprehensive lists of polypeptides

that have been crystallized, as well as the conditions under which they were crystallized. A compendium of crystals and crystallization recipes, as well as a repository of coordinates of solved protein structures, is maintained by the Protein Data Bank at the Brookhaven National Laboratory (www.rcsb.org/pdb/; Bernstein *et al.*, 1977, *J Mol Biol* 112: 535-542). These references can be used to determine the conditions necessary for crystallization of a polypeptide, as a prelude to the formation of appropriate polypeptide crystals and can guide the crystallization strategy for other polypeptide. It should be noted, however, that the conditions reported in most of the above-cited references have been optimized to yield, in most instances, a few large, diffraction quality crystals. Accordingly, it will be appreciated by those of skill in the art that some degree of adjustment of these conditions to provide a high yielding process for the large scale production of polypeptide crystals may be necessary.

In general, crystals are produced by combining the polypeptide to be crystallized with an appropriate aqueous solvent or aqueous solvent containing appropriate crystallization agents, such as salts or organic solvents or additives. The solvent is combined with the polypeptide and may be subjected to agitation at a temperature determined experimentally to be appropriate for the induction of crystallization and acceptable for the maintenance of polypeptide activity and stability. The solvent can optionally include co-solutes, such as divalent cations, co-factors, or chaotropes, as well as buffer species to control pH. "Co-solute means" for crystallization include compounds that can supply a co-solute to facilitate crystallization of a polypeptide. Examples of co-solute means include ammonium acetate, ammonium chloride, ammonium fluoride, ammonium formate, ammonium nitrate, ammonium phosphate, ammonium sulfate, cadmium chloride, cadmium sulfate, calcium acetate, calcium chloride, cesium chloride, cobaltous chloride, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Br}^-$ (CTAB), di-ammonium citrate, di-ammonium hydrogen phosphate, di-ammonium phosphate, di-ammonium tartrate, di-potassium phosphate, di-sodium phosphate, di-sodium tartrate, DL-malic acid, ferric chloride, L-proline, lithium acetate, lithium chloride, lithium nitrate, lithium sulfate, magnesium acetate, magnesium chloride, magnesium formate, magnesium nitrate, magnesium sulfate, nickel chloride, potassium acetate, potassium bromide, potassium chloride, potassium citrate, potassium fluoride, potassium formate, potassium nitrate, potassium phosphate, potassium sodium tartrate, potassium sulfate, potassium thiocyanate, sodium acetate, sodium bromide, sodium chloride, sodium citrate, sodium fluoride, sodium formate, sodium malonate, sodium nitrate, sodium phosphate, sodium sulfate, sodium thiocyanate, succinic acid, taurine, tri-ammonium citrate, tri-lithium citrate, trimethylamine N-oxide, tri-potassium citrate, tri-sodium citrate, zinc acetate, zinc sulfate, and other compounds that function to supply co-solutes. "Crystallization buffering means" include compounds that maintain the pH of a solution in a desired range to facilitate crystallization of a polypeptide. Examples of crystallization buffering means include ACES (*N*-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid), BES (*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid), Bicine (*N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)glycine), BIS-TRIS (2,2-bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol), boric acid, CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propane-

sulfonic acid), HPPS (HEPPS, 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-propanesulfonic acid), Gly-Gly ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$, glycyl-glycine), HEPES: (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid), Imidazole, MES (2-morpholinoethanesulfonic acid), MOPS (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid), PIPES (piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)), sodium acetate, sodium bicarbonate, sodium phosphate monobasic (sodium dihydrogen phosphate), TAPS (N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid), TAPSO (N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid), TES (N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic acid), Tricine (N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine), Tris-HCl, TRIZMA (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol), and other compounds that function to maintain a solution at or near a specified pH.

The need for co-solutes, buffers, etc. and their concentrations are determined experimentally to facilitate crystallization. Some examples of suitable crystallization conditions for a polypeptide are described in Examples 1, 2, and 3 below.

In an industrial-scale process, the controlled precipitation leading to crystallization can best be carried out by the simple combination of polypeptide, precipitant, co-solutes and, optionally, buffers in a batch process. As another option, polypeptides may be crystallized by using polypeptide precipitates as the starting material ("seeding"). In this case, polypeptide precipitates are added to a crystallization solution and incubated until crystals form. Alternative laboratory crystallization methods, such as dialysis or vapor diffusion, can also be adopted. McPherson, *supra* and Gilliland, *supra*, include a comprehensive list of suitable conditions in their reviews of the crystallization literature. Occasionally, in cases in which the crystallized polypeptide is to be crosslinked, incompatibility between an intended crosslinking agent and the crystallization medium might require exchanging the crystals into a more suitable solvent system.

According to one embodiment of this invention, polypeptide crystals, crystal formulations and compositions are prepared by the following process: first, the polypeptide is crystallized. Next, excipients or ingredients as described herein are added directly to the mother liquor. Alternatively, the crystals are suspended in a solution of excipient or other formulary ingredients, after the mother liquor is removed, for a minimum of 1 hour to a maximum of 24 hours. The excipient concentration is typically between about 0.01 to 30% W/W, which corresponds to a polypeptide crystal concentration of 99.99 to 70% W/W, respectively. In one embodiment, the excipient concentration is between about 0.1 to 10%, which corresponds to a crystal concentration of 99.9 to 90% W/W, respectively. The mother liquor can be removed from the crystal slurry either by filtration or by centrifugation. Subsequently, the crystals are washed optionally with solutions of 50 to 100% one or more organic solvents or additives such as, for example, ethanol, methanol, isopropanol or ethyl acetate, either at room temperature or at temperatures between -20°C to 25°C. The crystals are then dried either by passing a stream of nitrogen, air, or inert gas over the crystals. Alternatively, the crystals are dried by air drying or by lyophilization or by vacuum drying. The drying is carried out for a minimum 1 hour to a maximum of 72 hours after

washing, until the moisture content of the final product is below 10% by weight, most preferably below 5%. Finally, micronizing of the crystals can be performed if necessary. The drying of polypeptide crystals is the removal of water, organic solvent or additive, or liquid polymer by means including drying with N₂, air, or inert gases; vacuum oven drying; lyophilization; washing with a volatile organic solvent or additive followed by evaporation of the solvent; or evaporation in a fume hood. Typically, drying is achieved when the crystals become a free-flowing powder. Drying may be carried out by passing a stream of gas over wet crystals. The gas may be selected from the group consisting of: nitrogen, argon, helium, carbon dioxide, air or combinations thereof. The polypeptide crystals of the invention can be further processed to achieve a desired particle size distribution by micronizing in a suitable mill, such as a jet mill, and the components of the particle or powder formulation may be mixed before or after micronizing. The diameter of the particles achieved can be in the range of 0.1 to 100 micrometers, or in the range of 0.2 to 10 micrometers, or in the range of 10 to 50 micrometers, or in the range of 0.5 to 2 micrometers. For formulations to be administered by inhalation, in one embodiment the particles formed from the polypeptide crystals are in the range of 0.5 to 1 micrometers.

According to one embodiment of this invention, when preparing protein crystals, protein crystal formulations or compositions, enhancers, such as surfactants are not added during crystallization. Excipients or ingredients are added to the mother liquor after crystallization, at a concentration of between about 1-10% W/W, alternatively at a concentration of between about 0.1-25% W/W, alternatively at a concentration of between about 0.1-50% W/W. These concentrations correspond to crystal concentrations of 99-90% W/W, 99.9-75% W/W and 99.9-50% W/W, respectively. The excipient or ingredient is incubated with the crystals in the mother liquor for about 0.1-3 hrs, alternatively the incubation is carried out for 0.1-12 hrs, alternatively the incubation is carried out for 0.1-24 hrs.

In another embodiment of this invention, the ingredient or excipient is dissolved in a solution other than the mother liquor, and the protein crystals are removed from the mother liquor and suspended in the excipient or ingredient solution. The ingredient or excipient concentrations and the incubation times are the same as those described above.

Polypeptide Crystals

As used herein, "crystal" or "crystalline" refers to one form of the solid state of matter, which is distinct from a second form — the amorphous solid state. Crystals display characteristic features including a lattice structure, characteristic shapes, and optical properties such as refractive index and birefringence. A crystal consists of atoms arranged in a pattern that repeats periodically in three dimensions (C. S. Barrett, Structure of Metals, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1952, p.1). In contrast, amorphous material is a non-crystalline solid form of matter, sometimes referred to as an amorphous precipitate. Such precipitates have no molecular lattice structure characteristic

of the crystalline solid state and do not display birefringence or other spectroscopic characteristics typical of the crystalline forms of matter.

Polypeptide crystals are polypeptide molecules arranged in a crystal lattice. Polypeptide crystals contain a pattern of specific polypeptide-polypeptide interactions that are repeated periodically in three dimensions. The polypeptide crystals of this invention are to be distinguished from amorphous solid forms or precipitates of polypeptides, such as those obtained by lyophilizing a polypeptide solution.

In polypeptide crystals, the polypeptide molecules form asymmetric units which are arranged together to form symmetric units. The geometric structure of the symmetric units of polypeptide crystals can be cubic, hexagonal, monoclinic, orthorhombic, tetragonal, triclinic, or trigonal. The overall structure of the crystals in their entirety can be in the form of bipyramids, cubes, needles, plates, prisms, rhomboids, rods, or spheres, or combinations thereof. Crystals that are of the "cubic" structural class can more specifically have octadecahedral or dodecahedral crystal forms. The diameter of the crystals is defined as the Martin's diameter. It is measured as the length of the line, parallel to the ocular scale, that divides the randomly oriented crystals into two equal projected areas. Crystals in forms such as needles or rods will also have a maximal dimension that is referred to herein as the length of the crystal.

Formulations for Therapeutic Administration

As used herein, a "composition" is understood to mean a mixture comprising at least two components. In particular, the invention provides compositions comprising a crystalline TNFR2 polypeptide, or prepared using a crystalline TNFR2 polypeptide. In one embodiment of the invention, the composition or formulation comprising or prepared using a crystalline TNFR2 polypeptide is prepared such that it is suitable for injection and/or administration to a patient in need thereof. Compositions to be administered for pharmaceutical purposes to patients are substantially sterile and do not contain any agents that are unduly toxic or infectious to the recipient.

In one embodiment of the invention, crystalline TNFR2 polypeptides such as crystalline etanercept are administered in the form of a physiologically acceptable composition (also referred to herein as a pharmaceutical composition or as a pharmaceutical formulation) comprising a crystalline TNFR2 polypeptide that is formulated with one or more of the following: physiologically acceptable carriers, excipients, or diluents. Such carriers, excipients, or diluents are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed. Ordinarily, the preparation of such compositions entails combining the crystalline TNFR2 polypeptide with one or more of the following: buffers, antioxidants such as ascorbic acid, low molecular weight polypeptides (such as those having fewer than 10 amino acids), proteins, amino acids, carbohydrates such as glucose, sucrose or dextrins, chelating agents such as EDTA, glutathione and other stabilizers and excipients. In liquid formulations, neutral buffered saline or saline mixed with conspecific serum

albumin are exemplary appropriate diluents. In accordance with appropriate industry standards, preservatives may also be added, such as benzyl alcohol. Further examples of components that may be employed in pharmaceutical formulations are presented in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980, and in the *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, published jointly by the American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain.

In one embodiment, it is contemplated that the formulation of the invention is prepared in a bulk formulation and as such, the components of the pharmaceutical composition are adjusted so that they are higher than would be required for administration, and are diluted appropriately prior to administration.

The polypeptide crystals of the present invention can be formulated as a solid crystalline or powder formulation in forms suitable for storage and handling, and in forms suitable for inhalation or pulmonary administration, for example in the form of powders for the preparation of aerosol formulations. In an further embodiment, the polypeptide crystals can be formulated in a liquid solution of such crystals, or in a slurry of such crystals. In another embodiment, the polypeptide crystals are used to prepare a liquid formulation, such as an aqueous formulation, for therapeutic administration.

Solid Crystalline Formulations

Solid formulations of crystals are ideally suited for pulmonary administration, which is particularly useful for biological macromolecules which are difficult to deliver by other routes of administration. (See, for example, PCT patent applications WO 96/32152, WO 95/24183 and WO 97/41833).

Solid formulations of polypeptide crystals include crystals that have been substantially isolated from liquid solution or dried, and are present as free crystals or as particles in for example powder form. In the present context the expression "powder" refers to a collection of essentially dry particles, i.e. the moisture content being below about 10% by weight, or below 6 % by weight, or below 4% by weight. In one embodiment the invention provides a method for aerosolizing a dose of crystalline TNFR2 polypeptide comprising providing the crystalline TNFR2 polypeptide as a dry powder, dispersing an amount of the dry powder in a gas stream to form an aerosol, and capturing the aerosol in a chamber for subsequent inhalation.

Polypeptide crystals or powders can be optionally combined with carriers or surfactants. Suitable carrier agents include 1) carbohydrates, e.g. monosaccharides such as fructose, galactose, glucose, sorbose, and the like; 2) disaccharides, such as lactose, trehalose and the like; 3) polysaccharides, such as raffinose, malto-dextrins, dextrans, and the like; 4) alditols, such as mannitol, xylitol, and the like; 5) inorganic salts, such as sodium chloride, and the like; and 6) organic salts, such as sodium citrate, sodium ascorbate, and the like. In certain embodiments, the carrier is selected from the group consisting of trehalose, raffinose, mannitol, sorbitol, xylitol, inositol, sucrose, sodium chloride, and sodium citrate. Surfactants can be selected from the group

consisting of salts of fatty acids, bile salts or phospholipids. Fatty acids salts include salts of C₁₀₋₁₄ fatty acids, such as sodium caprate, sodium laurate, and sodium myristate. Bile salts include salts of ursodeoxycholate, taurocholate, glycocholate, and taurodihydrofusidate. In one embodiment, the surfactant is a salt of taurocholate such as sodium taurocholate. Phospholipids that can be used as surfactants include lysophosphatidylcholine. The molar ratio of crystalline polypeptide to surfactant in a powder formulation of the present invention is for example 9:1 to 1:9, or between 5:1 to 1:5, or between 3:1 to 1:3.

Crystals in Solution or Slurries

In one embodiment, this invention provides a method for rendering polypeptide crystals suitable for storage in suspensions comprising replacing the crystallization buffer (the mother liquor) with a non-aqueous solvent. In yet another embodiment, the crystalline slurry can be rendered solid by spinning out the first solvent and washing the remaining crystalline solid using a second organic solvent or additive to remove water, followed by evaporation of the non-aqueous solvent. Non-aqueous slurries of crystalline therapeutic proteins are especially useful for subcutaneous delivery.

In one such embodiment, the polypeptide crystals of the invention are combined with liquid organic additives with the object of stabilizing the polypeptide crystals. Such a mixture can be characterized as an aqueous-organic mixture that comprises n% organic additive, where n is between 1 and 99 and m% aqueous solution, where m is 100-n. Examples of organic additives include phenolic compounds, such as m-cresol or phenol or a mixture thereof, and acetone, methyl alcohol, methyl isobutyl ketone, chloroform, 1-propanol, isopropanol, 2-propanol, acetonitrile, 1-butanol, 2-butanol, ethyl alcohol, cyclohexane, dioxane, ethyl acetate, dimethylformamide, dichloroethane, hexane, isooctane, methylene chloride, tert-butyl alcohol, toluene, carbon tetrachloride, or combinations thereof.

Liquid Formulations

One embodiment of the present invention is directed to an aqueous formulation that allows for stable long-term storage of a pharmaceutical composition wherein a crystalline TNFR2 polypeptide is the active ingredient used in the preparation of the pharmaceutical composition. This formulation is useful, in part, because it is more convenient to use for the patient, as this formulation does not require any extra steps such as rehydrating. As used herein, a solution or liquid formulation is meant to mean a liquid preparation that contains one or more chemical substances dissolved in a suitable solvent or mixture of mutually miscible solvents.

Reconstitution is the dissolution of polypeptide crystals or crystal formulations or compositions in an appropriate buffer or pharmaceutical formulation.

Components of Pharmaceutical Formulations

The present pharmaceutical composition is prepared by combining, in addition to a crystalline TNFR2 polypeptide as described above, one or more of the following types of ingredients or excipients listed in the paragraphs below, many or all of which are available from

commercial suppliers. It will be understood one of ordinary skill in the art that the combining of the various components to be included in the composition can be done in any appropriate order, namely, the buffer can be added first, middle or last and the tonicity modifier can also be added first, middle or last. It is also to be understood by one of ordinary skill in the art that some of these chemicals can be incompatible in certain combinations, and accordingly, are easily substituted with different chemicals that have similar properties but are compatible in the relevant mixture. There is knowledge in the art regarding the suitability of various combinations of excipients and other ingredients or materials present in, for example, the containers used for storage of the pharmaceutical composition and/or the devices used for therapeutic administration (see, for example, Akana, 2002, *J Pharm Sci* 91: 2283-2300).

Acidifying agents ("acidifying means"): acetic acid, glacial acetic acid, citric acid, fumaric acid, hydrochloric acid, diluted hydrochloric acid, malic acid, nitric acid, phosphoric acid, diluted phosphoric acid, sulfuric acid, tartaric acid, and other suitable acids.

Active ingredients: additional active ingredients can also be included in the presently described composition, for example, to reduce injection site discomfort. Such active ingredients include, but are not limited to non-steroidal anti-inflammatory drugs such as, for example, tromethamine, in an appropriate dosage.

Aerosol propellants ("propellant means"): butane, dichlorodifluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, isobutane, propane, trichloromonofluoromethane.

Aggregation inhibitors ("aggregation inhibiting means") reduce a polypeptide's tendency to associate in inappropriate or unwanted ternary or quaternary complexes. Suitable aggregation inhibitors include the amino acids L-arginine and/or, L-cysteine, which can act to reduce aggregation of polypeptides containing an Fc domain over long periods, e.g., two years or more. The concentration of the aggregation inhibitor in the formulation can be between about 1 mM to 1M, or about 10 mM to about 200 mM, or about 10 mM to about 100 mM, or about 15 mM to about 75 mM, or about 25 mM.

Alcohol denaturants ("denaturant means"): denatonium benzoate, methyl isobutyl ketone, sucrose octacetate.

Alkalisng agents ("alkalizing means"): strong ammonia solution, ammonium carbonate, diethanolamine, diisopropanolamine, potassium hydroxide, sodium bicarbonate, sodium borate, sodium carbonate, sodium hydroxide, triamine.

Anticaking agents ("anticaking means"): calcium silicate, magnesium silicate, colloidal silicon dioxide, talc.

Antifoaming agents ("antifoaming means"): dimethicone, simethicone.

Antioxidants ("antioxidant means") may be included in the formulations of the present invention. Anti-oxidants contemplated for use in the preparation of the formulations include amino acids such as glycine and lysine, chelating agents such as EDTA and DTPA, and free-radical scavengers such as sorbitol and mannitol. Additional antioxidants include ascorbic acid, ascorbyl

palmitate, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, hypophosphorous acid, monothio-
glycerol, propyl gallate, sodium bisulfite, sodium formaldehyde sulfoxylate, sodium metabisulfite,
sodium thiosulfate, sulfur dioxide, tocopherol, and tocopherols excipient. Also contemplated for
5 use in inhibiting oxidation is nitrogen or carbon dioxide overlay. Nitrogen or carbon dioxide
overlay can be introduced to the headspace of a vial or prefilled syringe during the filling process.

Buffering agents ("formulation buffering means") maintain the pH of the pharmaceutical
formulation in a desired range. When the pH of the pharmaceutical composition is set at or near
physiological levels, comfort of the patient upon administration is maximized. In particular, in
10 certain embodiments the pH of a pharmaceutical composition is within a pH range of about 4.0 to
8.4, or a pH range of about 5.0 to 8.0, or a pH range of about 5.8 to 7.4, or about 6.2 to 7.0. It is to
be understood that the pH can be adjusted as necessary to maximize stability and solubility of the
polypeptide in a particular formulation and as such, a pH outside of physiological ranges, yet
tolerable to the patient, is within the scope of the invention. Various buffers suitable for use in the
15 pharmaceutical composition of the invention include histidine, alkali salts (sodium or potassium
phosphate or their hydrogen or dihydrogen salts), sodium citrate/citric acid, sodium acetate/acetic
acid, potassium citrate, maleic acid, ammonium acetate, tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (tris),
various forms of acetate and diethanolamine, ammonium carbonate, ammonium phosphate, boric
acid, lactic acid, phosphoric acid, potassium metaphosphate, potassium phosphate monobasic,
sodium lactate solution, and any other pharmaceutically acceptable pH buffering agent known in
20 the art. pH-adjusting agents such as hydrochloric acid, sodium hydroxide, or a salt thereof, may
also be included in order to obtain the desired pH. One suitable buffer is sodium phosphate for
maintaining pharmaceutical compositions at or near pH 6.2. In another example, acetate is a more
efficient buffer at pH 5 than pH 6 so less acetate may be used in a solution at pH 5 than at pH 6.
The concentration of the buffer in the formulation can be between about 1 mM to about 1M, or
25 about 10 mM to about 200 mM.

Chelating agents ("chelating means", also called sequestering agents): edetate disodium,
ethylenediaminetetraacetic acid and salts, edetic acid.

Coating agents ("coating means"): sodium carboxymethylcellulose, cellulose acetate,
cellulose acetate phthalate, ethylcellulose, gelatin, pharmaceutical glaze, hydroxypropyl cellulose,
30 hydroxypropyl methylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose phthalate, methacrylic acid
copolymer, methylcellulose, polyethylene glycol, polyvinyl acetate phthalate, shellac, sucrose,
titanium dioxide, carnauba wax, microcrystalline wax, zein.

Colors ("coloring means"): caramel; erythrosins (FD&C Red No. 3); FD&C Red No. 40;
FD&C Yellow No. 5; FD&C Yellow No. 6; FD&C Blue No. 1; red, yellow, black, blue or blends;
35 ferric oxide.

Complexing agents ("complex-forming means"): ethylenediaminetetraacetic acid and
salts (EDTA), edetic acid, gentisic acid ethanolamide, oxyquinoline sulfate.

Dessiccants ("dessicating means"): calcium chloride, calcium sulfate, silicon dioxide.

Filtrating aids ("filtrating means"): powdered cellulose, purified siliceous earth.

Flavors and perfumes ("flavoring means"): anethole, anise oil, benzaldehyde, cinnamon oil, cocoa, ethyl vanillin, menthol, methyl salicylate, monosodium glutamate, orange flower oil, orange oil, peppermint, peppermint oil, peppermint spirit, rose oil, stronger rose water, thymol, tolu balsam tincture, vanilla, vanilla tincture, vanillin.

Humectants ("moisture-retaining means"): glycerin, hexylene glycol, propylene glycol, sorbitol.

Ointment bases ("ointment means"): lanolin, anhydrous lanolin, hydrophilic ointment, white ointment, yellow ointment, polyethylene glycol ointment, petrolatum, hydrophilic petrolatum, white petrolatum, rose water ointment, squalene.

Plasticizers ("plasticizing means"): castor oil, diacetylated monoglycerides, diethyl phthalate, glycerin, mono- and di-acetylated monoglycerides, polyethylene glycol, propylene glycol, triacetin, triethyl citrate.

Polymer membranes: cellulose acetate.

Polymeric carriers ("carrier means") are polymers used for encapsulation of polypeptide crystals for delivery of polypeptide, including biological delivery. Such polymers include biocompatible and biodegradable polymers. The polymeric carrier may be a single polymer type or it may be composed of a mixture of polymer types. Polymers useful as the polymeric carrier, include for example, poly (acrylic acid), poly (cyanoacrylates), poly (amino acids), poly (anhydrides), poly (dipeptides), poly (esters) such as poly (lactic acid) or PLA, poly (lactic-co-glycolic acid) or PLGA, poly (D-hydroxybutyrate), poly (caprolactone) and poly (dioxanone); poly (ethylene glycol), poly ((hydroxypropyl)methacrylamide, poly [(organo)phosphazene], poly (ortho esters), poly (vinyl alcohol), poly (vinylpyrrolidone), maleic anhydride-alkyl vinyl ether copolymers, pluronic polyols, albumin, natural and synthetic polypeptides, alginate, cellulose and cellulose derivatives, collagen, fibrin, gelatin, hyaluronic acid, oligosaccharides, glycosaminoglycans, sulfated polysaccharides, or any conventional material that will encapsulate polypeptide crystals.

Preservatives (or "preserving means"), such as antimicrobial preservatives, contemplated for use in the formulations of the present invention, such as multi-dose formulations, include benzalkonium chloride, benzalkonium chloride solution, benzethonium chloride, benzoic acid, benzyl alcohol, butylparaben, cetylpyridinium chloride, chlorobutanol, chlorocresol, cresol, dehydroacetic acid, ethylparaben, methylparaben, methylparaben sodium, phenol, phenylethyl alcohol, phenylmercuric acetate, phenylmercuric nitrate, potassium benzoate, potassium sorbate, propylparaben, propylparaben sodium, sodium benzoate, sodium dehydroacetate, sodium propionate, sorbic acid, thimerosal, and thymol. The amount of preservative included will be in the range of 0% to 2% (w/v) or about 1% (w/v).

Solubilizing agents and stabilizers ("solubilizing means" or "stabilizing means"), also referred to as emulsifying agents, co-solutes, or co-solvents) that increase the solubility of the polypeptide and/or stabilize the polypeptide while in solution (or in dried or frozen forms) can also

be added to a pharmaceutical composition. Examples of solubilizing and stabilizing agents include but are not limited to sugars/polyols such as: sucrose, lactose, glycerol, xylitol, sorbitol, mannitol, maltose, inositol, trehalose, glucose; polymers such as: serum albumin (bovine serum albumin (BSA), human SA (HSA), or recombinant HA), dextran, PVA, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), polyethylencimine, gelatin, polyvinylpyrrolidone (PVP), hydroxyethylcellulose (HEC);
 5 non-aqueous solvents such as: polyhydric alcohols (e.g., PEG, ethylene glycol and glycerol), dimethylsulfoxide (DMSO), and dimethylformamide (DMF); amino acids such as: proline, L-methionine, L-serine, sodium glutamic acid, alanine, glycine, lysine hydrochloride, sarcosine, and gamma-aminobutyric acid; surfactants such as: Tween-80, Tween-20, SDS, polysorbate,
 10 polyoxyethylene copolymer; and miscellaneous stabilizing excipients such as: potassium phosphate, sodium acetate, ammonium sulfate, magnesium sulfate, sodium sulfate, trimethylamine N-oxide, betaine, metal ions (e.g., zinc, copper, calcium, manganese, and magnesium), CHAPS, monolaurate, 2-O-beta-mannoglycerate; or any of the following: acacia, cholesterol, diethanolamine (adjunct), glyceryl monostearate, lanolin alcohols, lecithin, mono- and di-
 15 glycerides, monoethanolamine (adjunct), oleic acid (adjunct), oleyl alcohol (stabilizer), poloxamer, polyoxyethylene 50 stearate, polyoxyl 35 castor oil, polyoxyl 40 hydrogenated castor oil, polyoxyl 10 oleyl ether, polyoxyl 20 cetostearyl ether, polyoxyl 40 stearate, polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60, polysorbate 80, propylene glycol diacetate, propylene glycol monostearate, sodium lauryl sulfate, sodium stearate, sorbitan monolaurate, sorbitan monooleate, sorbitan monopalmitate,
 20 sorbitan monostearate, stearic acid, trolamine, emulsifying wax; wetting and/or solubilizing agents such as benzalkonium chloride, benzethonium chloride, cetylpyridinium chloride, docusate sodium, nonoxynol 9, nonoxynol 10, octoxynol 9, polyoxyl 50 stearate, tyloxapol; or any combination of the above. The concentration of solubilizers/stabilizers in the formulation can be between about 0.001 to 5 weight percent, or about 0.1 to 2 weight percent. In one embodiment, the stabilizer is
 25 selected from sorbitan mono-9-octadecenoate poly(oxy-1,2-ethanediyl) derivatives, including but not limited to, polysorbate 80 or polysorbate 20. The amount of polysorbate 20 or 80 to be used in this embodiment is in the range of 0.001% to 0.1% (w/v), such as 0.005% (w/v), in single use or in multi-dose formulations. In another embodiment, free L-methionine in the range of 0.05mM to 50mM is included in the formulation: the amount of free L-methionine is 0.05mM to 5mM for
 30 single use formulations, and 1mM to 10mM for multi-dose formulations.

Solvents ("means for dissolving"): acetone, alcohol, diluted alcohol, amylene hydrate, benzyl benzoate, butyl alcohol, carbon tetrachloride, chloroform, corn oil, cottonseed oil, ethyl acetate, glycerin, hexylene glycol, isopropyl alcohol, methyl alcohol, methylene chloride, methyl isobutyl ketone, mineral oil, peanut oil, polyethylene glycol, propylene carbonate, propylene
 35 glycol, sesame oil, water for injection, sterile water for injection, sterile water for irrigation, purified water.

Sorbents (also called adsorbents, "adsorbing means"): powdered cellulose, charcoal, purified siliceous earth; and carbon dioxide sorbents: barium hydroxide lime, soda lime.

Stiffening agents ("stiffening means"): hydrogenated castor oil, cetoctearyl alcohol, cetyl alcohol, cetyl esters wax, hard fat, paraffin, polyethylene excipient, stearyl alcohol, emulsifying wax, white wax, yellow wax.

Suppository bases ("suppository means"): cocoa butter, hard fat, polyethylene glycol.

5 Suspending and/or viscosity-increasing agents ("viscosity-increasing means"): acacia, agar, alginic acid, aluminum monostearate, bentonite, purified bentonite, magna bentonite, carbomer 934p, carboxymethylcellulose calcium, carboxymethylcellulose sodium, carboxymethylcellulose sodium 12, carrageenan, microcrystalline and carboxymethylcellulose sodium cellulose, dextrin, gelatin, guar gum, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, 10 hydroxypropyl methylcellulose, magnesium aluminum silicate, methylcellulose, pectin, polyethylene oxide, polyvinyl alcohol, povidone, propylene glycol alginate, silicon dioxide, colloidal silicon dioxide, sodium alginate, tragacanth, xanthan gum.

15 Sweetening agents ("sweetening means"): aspartame, dextrates, dextrose, excipient dextrose, fructose, mannitol, saccharin, calcium saccharin, sodium saccharin, sorbitol, solution sorbitol, sucrose, compressible sugar, confectioner's sugar, syrup.

Tablet binders ("tablet binding means"): acacia, alginic acid, sodium carboxymethylcellulose, microcrystalline cellulose, dextrin, ethylcellulose, gelatin, liquid glucose, guar gum, hydroxypropyl methylcellulose, methylcellulose, polyethylene oxide, povidone, pregelatinized starch, syrup.

20 Tablet and/or capsule diluents ("diluent means"): calcium carbonate, dibasic calcium phosphate, tribasic calcium phosphate, calcium sulfate, microcrystalline cellulose, powdered cellulose, dextrates, dextrin, dextrose excipient, fructose, kaolin, lactose, mannitol, sorbitol, starch, pregelatinized starch, sucrose, compressible sugar, confectioner's sugar.

25 Tablet disintegrants ("tablet disintegrant means"): alginic acid, microcrystalline cellulose, croscarmellose sodium, crospovidone, polacrillin potassium, sodium starch glycolate, starch, pregelatinized starch.

Tablet and/or capsule lubricants ("lubricating means"): calcium stearate, glyceryl behenate, magnesium stearate, light mineral oil, polyethylene glycol, sodium stearyl fumarate, stearic acid, purified stearic acid, talc, hydrogenated vegetable oil, zinc stearate.

30 Tonicity modifiers ("tonicity modifying means") are understood to be molecules that contribute to the osmolality of a solution. The osmolality of a pharmaceutical composition is preferably regulated in order to maximize the active ingredient's stability and also to minimize discomfort to the patient upon administration. Serum is approximately 300 +/- 50 milliosmoles per kilogram. It is generally preferred that a pharmaceutical composition be isotonic with serum, 35 i.e., having the same or similar osmolality, which is achieved by addition of a tonicity modifier, thus it is contemplated that the osmolality will be from about 180 to about 420 milliosmoles, however, it is to be understood that the osmolality can be either higher or lower as specific conditions require. Examples of tonicity modifiers suitable for modifying osmolality include, but

are not limited to amino acids (e.g., arginine, cysteine, histidine and glycine), salts (e.g., sodium chloride, potassium chloride and sodium citrate) and/or saccharides (e.g., sucrose, glucose, dextrose, glycerin, and mannitol). The concentration of the tonicity modifier in the formulation can be between about 1 mM to 1M, or about 10 mM to about 200 mM. In one embodiment, the tonicity modifier is sodium chloride within a concentration range of 0mM to 200mM. In another embodiment, the tonicity modifier is sorbitol or trehalose and no sodium chloride is present.

Vehicles ("vehicle means"): flavored and/or sweetened (aromatic elixir, compound benzaldehyde elixir, iso-alcoholic elixir, peppermint water, sorbitol solution, syrup, tolu balsam syrup); oleaginous (almond oil, corn oil, cottonseed oil, ethyl oleate, isopropyl myristate, isopropyl palmitate, mineral oil, light mineral oil, myristyl alcohol, octyldodecanol, olive oil, peanut oil, persea oil, sesame oil, soybean oil, squalene); solid carriers such as sugar spheres; sterile (bacteriostatic water for injection, bacteriostatic sodium chloride injection).

Water-repelling agent ("water-repelling means"): cyclomethicone, dimethicone, simethicone.

In certain embodiments, the pharmaceutical composition comprises a compound selected from the following, or any combination thereof: salts of 1) amino acids such as glycine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, asparagine, glutamine, proline; 2) carbohydrates, e.g. monosaccharides such as glucose, fructose, galactose, mannose, arabinose, xylose, ribose; 3) disaccharides, such as lactose, trehalose, maltose, sucrose; 4) polysaccharides, such as maltodextrins, dextrans, starch, glycogen; 5) alditols, such as mannitol, xylitol, lactitol, sorbitol; 6) glucuronic acid, galacturonic acid; 7) cyclodextrins, such as methyl cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and alike; 8) inorganic salts, such as sodium chloride, potassium chloride, magnesium chloride, phosphates of sodium and potassium, boric acid ammonium carbonate and ammonium phosphate; 9) organic salts, such as acetates, citrates, ascorbates, lactates; 10) emulsifying or solubilizing agents like acacia, diethanolamine, glyceryl monostearate, lecithin, monoethanolamine, oleic acid, oleyl alcohol, poloxamer, polysorbates, sodium lauryl sulfate, stearic acid, sorbitan monolaurate, sorbitan monostearate, and other sorbitan derivatives, polyoxyl derivatives, wax, polyoxyethylene derivatives, sorbitan derivatives; 11) viscosity increasing reagents like, agar, alginate acid and its salts, guar gum, pectin, polyvinyl alcohol, polyethylene oxide, cellulose and its derivatives propylene carbonate, polyethylene glycol, hexylene glycol, tyloxapol; and 12) particular ingredients such as sucrose, trehalose, lactose, sorbitol, lactitol, inositol, salts of sodium and potassium such as acetate, phosphates, citrates, borate, glycine, arginine, polyethylene oxide, polyvinyl alcohol, polyethylene glycol, hexylene glycol, methoxy polyethylene glycol, gelatin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

Sustained-Release Forms

In one preferred embodiment of the invention, sustained-release forms (also called "controlled-release" forms) of crystalline TNFR2 polypeptides are used, including sustained-release forms of crystalline TNFR2-Fc; sustained- or controlled-release forms comprise crystalline

polypeptide and a substance (the "sustained-release means") for extending the physical release or biological availability of the crystalline polypeptide over a desired period of time. Sustained-release forms suitable for use in the disclosed methods include, but are not limited to, crystalline TNFR2 polypeptides that are encapsulated in sustained-release means such as a slowly-dissolving biocompatible polymer (for example, the polymeric carriers described herein, the alginate microparticles described in U.S. 6,036,978, or the polyethylene-vinyl acetate and poly(lactic-glucoic acid) compositions described in U.S. 6,083,534), admixed with such a polymer (including topically applied hydrogels), and or encased in a biocompatible semi-permeable implant. Further embodiments of the invention include additional sustained-release forms such as polymeric microparticles, wherein a mixture of the active ingredient and sustained-release means such as polymers (for example, PLGA) are dispersed within a continuous phase, and the resulting dispersion is directly lyophilized to remove water and organic solvents or additives and form said microparticles (U.S. Patent No. 6,020,004); injectable gel compositions comprising a biodegradable anionic polysaccharide such as an alginate ester, a polypeptide, and at least one bound polyvalent metal ion (U.S. Patent No. 6,432,449); injectable biodegradable polymeric matrices having reverse thermal gelation properties and optionally pH-responsive gelation/de-gelation properties (U.S. Patent Nos. 6,541,033 and 6,451,346); biocompatible polyol:oil suspensions, such as those wherein the suspension comprises polyol in the range of from about 15% to about 30% by weight (U.S. Patent No. 6,245,740). Such sustained release forms are suitable for continuous delivery of polypeptides through administration in the form of a depot, wherein the depot can be an implant, or can be in the form of injectable microspheres, nanospheres, or gels. The above listed U.S. patents (U.S. Patent Nos. 6,036,978; 6,083,534; 6,020,004; 6,432,449; 6,541,033; 6,451,346, and 6,245,740) are incorporated in their entirety by reference herein. In addition, sustained- or controlled-release forms of crystalline polypeptides of the invention comprise types of sustained release means such as those described in Kim, C., 2000, "Controlled Release Dosage Form Design", Technomic Publishing Co., Lancaster PA, which include the following: natural polymers (gelatin, sodium alginate acid, xanthan gum, arabic gum, or chitosan), semi-synthetic polymers or cellulose derivatives (methylcellulose, ethylcellulose, hydroxyethylcellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxyethylmethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, cellulose acetate, cellulose acetate butyrate, cellulose acetate propionate, cellulose acetatephthalate, or hydroxypropylmethylcellulose phthalate), and synthetic polymers (ion exchange resins (methacrylic acid, sulfonated polystyrene / divinylbenzene), polyacrylic acid (Carbopol), poly(MMA/MAA), poly(MMA/DEAMA), poly(MMA/EA), poly(vinylacetate phthalate), poly(vinyl alcohol), poly(vinyl pyrrolidone), poly(lactic acid), poly(glycolic acid), poly(lactic/glycolic acid), polyethylene glycol, polyethylene oxide, poly(dimethyl silicone), poly(hydroxyethyl methacrylate), poly(ethylene/vinyl acetate), poly(ethylene/vinyl alcohol), polybutadiene, poly(anhydride), poly(orthoester), and poly(glutamic acid)).

Further embodiments of the invention include TNFR2 polypeptide crystals encapsulated in at least one polymeric carrier to form microspheres by virtue of encapsulation within the matrix of the polymeric carrier to preserve their native and biologically active tertiary structure, as described in U.S. Patent No. 6,541,606, which is incorporated in its entirety by reference herein.

5 TNFR2 polypeptide crystals or formulations thereof to be encapsulated are suspended in a polymeric carrier such as PLGA which is dissolved in an organic solvent or additive. Such encapsulated TNFR2 polypeptide crystals maintain the biological activity of the TNFR2 polypeptide for a longer period of time than TNFR2 polypeptides in solution when stored under comparable conditions.

10 Illustrative Embodiments

The formulation can comprise about 25 to about 50 mg TNFR2 polypeptide or etanercept, wherein the TNFR2 polypeptide or etanercept are reconstituted from crystalline forms, about 10 mM to about 100 mM L-arginine, about 10 mM to about 50 mM sodium phosphate, about 0.75% to about 1.25% sucrose, about 50 mM to about 150 mM NaCl, at about pH 6.0 to about pH 7.0. In
15 another embodiment L-arginine can be replaced with L-cysteine (at about 1 to about 500 micromolar) in the formulation. In another embodiment, the pH can be about pH 7.0. In another embodiment, the pharmaceutical composition comprises 25 mg/mL crystalline TNFR2, about 25 mM L-arginine, about 25 mM sodium phosphate, about 98 mM sodium chloride, and about 1% sucrose at pH 6.2. In another embodiment, wherein the crystalline etanercept or the etanercept
20 reconstituted from crystalline form has a higher level of biological activity per unit of etanercept than non-crystallized etanercept preparations, the formulation can comprise about 10 to about 50 mg crystalline etanercept or etanercept reconstituted from crystalline form, or about 15 to about 25 mg crystalline etanercept or etanercept reconstituted from crystalline form.

Testing Formulations for Polypeptide Stability and Biological Activity

25 In yet another embodiment, the invention provides a method for accelerated stability testing of the stability of a crystalline TNFR2 polypeptide in a pharmaceutical composition of the invention comprising the steps of testing the activity of the polypeptide formulated according to the invention prior to storage, i.e., time zero; storing the composition at 37°C for one month and measuring the stability of the polypeptide; and comparing the stability from time zero to the one
30 month time point. This information is helpful for early elimination of batches or lots that appear to have good stability initially, yet do not store well for longer periods.

Moreover, the present pharmaceutical composition provides improved long-term storage such that the active ingredient, e.g., a crystalline TNFR2 polypeptide, is stable over the course of storage either in liquid or frozen states. As used herein, the phrase "long-term" storage is
35 understood to mean that the pharmaceutical composition can be stored for three months or more, for six months or more, and preferably for one year or more. Long term storage is also understood to mean that the pharmaceutical composition is stored either as a liquid at 2-8°C or is frozen, e.g.,

at -20°C or colder. It is also contemplated that the composition can be frozen and thawed more than once. The term "stable" with respect to long-term storage is understood to mean that the active polypeptide of the pharmaceutical composition does not lose more than 20%, or more preferably 15%, or even more preferably 10%, and most preferably 5% of its activity relative to activity of the composition at the beginning of storage. Activity of the TNFR2 polypeptide can be assayed by any one of a number of assays, including ligand-binding assays such as ELISA assays, where ligand is bound to a solid support, test and control preparations of TNFR2 polypeptides are added, and binding of the TNFR2 polypeptide to the ligand is detected using labeled anti-Ig antibodies directed to the Ig component of the TNFR2 polypeptide. In addition, assays such as those described in Example 6 can be used to detect biological activity of TNFR2 polypeptides that bind TNF, or can be modified to test activity of TNFR2 polypeptides that bind other ligands.

Administration and Dosing

As used herein, "administration of crystalline TNFR2" or "administration of crystalline TNFR2 polypeptides" means the administration of a pharmaceutical composition comprising crystalline TNFR2 polypeptides, or prepared using crystalline TNFR2 polypeptides.

Any efficacious route of administration may be used to therapeutically administer crystalline TNFR2. If injected, crystalline TNFR2 can be administered, for example, via intra-articular, intravenous, intramuscular, intralesional, intraperitoneal, or subcutaneous routes by bolus injection or by continuous infusion. Other suitable means of administration include sustained release from implants, depots (implanted or injected), suppositories, aerosol inhalation, eyedrops, oral preparations, including pills, syrups, lozenges, or chewing gum, and topical preparations such as lotions, gels, sprays, ointments, or other suitable techniques. When crystalline TNFR2 is administered in combination with one or more other biologically active compounds, these may be administered by the same or by different routes, and may be administered simultaneously, separately, or sequentially.

Appropriate dosages can be determined in standard dosing trials, and may vary according to the chosen route of administration. The amount and frequency of administration will depend on such factors as the nature and severity of the indication being treated, the desired response, the age and condition of the patient, and so forth. In the following dosing regimens, the amount of crystalline TNFR2 administered is understood to be the amount of crystalline TNFR2 for pharmaceutical compositions comprising crystalline TNFR2, or the amount of TNFR2 polypeptide for pharmaceutical compositions prepared using crystalline TNFR2.

In one embodiment of the invention, crystalline TNFR2 is administered one time per week to treat a medical disorder or condition disclosed herein, in another embodiment is administered at least two times per week, and in another embodiment is administered at least three times per week. An adult patient is a person who is 18 years of age or older. If injected, the effective amount of crystalline TNFR2 per adult dose ranges from 1-20 mg/m² of body surface area, and preferably is

about 5-12 mg/m². Alternatively, a flat dose may be administered, whose amount may range from 5-100 mg/dose. Exemplary dose ranges for a flat dose to be administered by subcutaneous injection are 5-25 mg/dose, 25-50 mg/dose, and 50-100 mg/dose. In one embodiment of the invention, the various indications described below are treated by administering a preparation acceptable for injection containing or prepared from crystalline TNFR2 at 25 mg TNFR2 per dose, or alternatively, containing 50 mg per dose. The 25 mg or 50 mg dose may be administered repeatedly, particularly for chronic conditions. If a route of administration other than injection is used, the dose is appropriately adjusted in accord with standard medical practices. In many instances, an improvement in a patient's condition will be obtained by injecting a dose of about 25 mg of crystalline TNFR2 one to three times per week over a period of at least three weeks, or a dose of 50 mg of crystalline TNFR2 one or two times per week for at least three weeks, though treatment for longer periods may be necessary to induce the desired degree of improvement. For incurable chronic conditions, the regimen may be continued indefinitely, with adjustments being made to dose and frequency if such are deemed necessary by the patient's physician.

For pediatric patients (age 4-17), a suitable regimen involves the subcutaneous injection of 0.4 mg/kg of body weight, up to a maximum of 25 mg per dose of crystalline TNFR2, administered by subcutaneous injection one or more times per week.

In addition to human patients, crystalline TNFR2 polypeptides are useful in the treatment of medical conditions as described herein afflicting non-human animals, such as pets (dogs, cats, birds, primates, etc.), domestic farm animals (horses, cattle, sheep, pigs, birds, etc.), or any animal that suffers from a condition comparable to one of the conditions described herein. In such instances, an appropriate dose may be determined according to the animal's body weight. For example, a dose of 0.2-1 mg/kg may be used. Alternatively, the dose is determined according to the animal's surface area, an exemplary dose ranging from 0.1-20 mg/m² of body surface area, or more preferably, from 5-12 mg/m² of body surface area. For small animals, such as dogs or cats, a suitable dose is 0.4 mg/kg of body weight. In another embodiment, crystalline TNFR2 (where the TNFR2 polypeptide is preferably expressed from genes derived from the same species as the patient) is administered by injection or other suitable route one or more times per week until the animal's condition is improved, or it may be administered indefinitely.

In another embodiment, wherein the crystalline TNFR2 polypeptide or the TNFR2 polypeptide reconstituted from crystalline form has a higher level of biological activity per unit of TNFR2 polypeptide than non-crystallized TNFR2 polypeptide preparations, the dosages given above can be reduced appropriately, based on the degree of increase in biological activity of the crystalline TNFR2 polypeptide. For example, the dosages above can be reduced to 50% of the above dosages and dosage ranges if crystallization increases biological activity two-fold per unit of TNFR2 polypeptide; in other embodiments, the dosages are reduced to 10 to 95% of the above dosages, or to 25 to 75% of the above dosages, or to 60% or 70% or 80% of the above dosages.

The invention further includes the administration of crystalline TNFR2 concurrently with one or more other drugs that are administered to the same patient in combination with the pharmaceutical composition comprising crystalline TNFR2 polypeptides, or prepared using crystalline TNFR2 polypeptides, each drug being administered according to a regimen suitable for that medicament. "Concurrent administration" encompasses simultaneous or sequential treatment with the components of the combination, as well as regimens in which the drugs are alternated, or wherein one component is administered long-term and the other(s) are administered intermittently. Components may be administered in the same or in separate compositions, and by the same or different routes of administration.

10 Therapeutic Uses

The invention pertains to methods for treating various medical disorders by administering crystalline TNFR2 polypeptides. The crystalline TNFR2 polypeptides may be administered in combination with other biologically active molecules, in a manner exemplified by, but not limited to, the combination and/or concurrent therapies described herein. This invention provides compounds, compositions, and methods for treating a mammalian patient, including a human patient, who is suffering from a medical disorder. For purposes of this disclosure, the terms "illness," "disease," "medical condition," "abnormal condition" and the like are used interchangeably with the term "medical disorder."

In accordance with this invention, patients having medical disorders are administered a therapeutically effective amount of a crystalline TNFR2 polypeptide. The crystalline TNFR2 polypeptide can be the crystalline form of a TNF-alpha-binding soluble TNF-alpha receptor such as crystalline TNFR2:Fc. As used herein, the phrase "administering a therapeutically effective amount" of a therapeutic agent means that the patient is treated with the agent in an amount and for a time sufficient to induce a sustained improvement over baseline in at least one indicator that reflects the severity of the disorder. An improvement is considered "sustained" if the patient exhibits the improvement on at least two occasions separated by one or more weeks. The degree of improvement is determined based on signs or symptoms, and determinations may also employ questionnaires that are administered to the patient, such as quality-of-life questionnaires. Various indicators that reflect the extent of the patient's illness may be assessed for determining whether the amount and time of the treatment is sufficient. The baseline value for the chosen indicator or indicators is established by examination of the patient prior to administration of the first dose of the crystalline antagonist or other crystalline TNFR2 polypeptide. Preferably, the baseline examination is done within about 60 days of administering the first dose. If the crystalline TNFR2 polypeptide is being administered to treat acute symptoms, such as for example to treat a traumatic knee injury, the first dose is administered as soon as practically possible after the injury has occurred.

Improvement is induced by administering crystalline TNFR2 polypeptide until the patient manifests an improvement over baseline for the chosen indicator or indicators. In treating chronic conditions, this degree of improvement is obtained by repeatedly administering this medicament over a period of at least a month or more, e.g., for one, two, or three months or longer, or indefinitely. A period of one to six weeks, or even a single dose, often is sufficient for treating acute conditions. For injuries or acute conditions, a single dose may be sufficient. Although the extent of the patient's illness after treatment may appear improved according to one or more indicators, treatment may be continued indefinitely at the same level or at a reduced dose or frequency. Once treatment has been reduced or discontinued, it later may be resumed at the original level if symptoms should reappear.

In one embodiment, the medical disorders to be treated with crystalline TNFR2 polypeptides are characterized by abnormal or excessive TNF-alpha levels. It has been proposed that a systemic or localized excess of TNF-alpha contributes to the progression of numerous medical disorders. For example, patients with chronic heart failure have elevated levels of serum TNF-alpha, which have been shown to increase with disease progression (see, for example, Levine et al., *N Eng J Med* 323:236-241, 1990). A variety of other diseases are associated with elevated levels of TNF-alpha (see, for example, Feldman et al., *Transplantation Proceedings* 30:4126-4127, 1998). It has been suggested that the suppression of TNF-alpha might be beneficial in patients suffering from disorders characterized by abnormal or excessive TNF-alpha expression. However, although progress has been made in devising effective treatment for such diseases, improved medicaments and methods of treatment are needed.

Provided herein are methods for treating a number of medical disorders characterized by abnormal TNF-alpha expression by administering crystalline TNFR2 polypeptides, such as the crystalline form of a soluble TNF-alpha receptor such as TNFR2:Fc, for a period of time sufficient to induce a sustained improvement in the patient's condition. The subject methods involve administering to the patient a formulation comprising, or prepared using, a crystalline TNFR2 polypeptide that is capable of reducing the effective amount of endogenous biologically active TNF-alpha, such as by preventing the binding of TNF-alpha to its cell surface receptor (TNFR).

Cardiovascular Disorders

Cardiovascular disorders are treatable with the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, pharmaceutical compositions thereof, and/or combination therapies. Examples of cardiovascular disorders treatable with a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc, include: aortic aneurisms; arteritis; vascular occlusion, including cerebral artery occlusion; complications of coronary by-pass surgery; ischemia/reperfusion injury; heart disease, including atherosclerotic heart disease, myocarditis, including chronic autoimmune myocarditis and viral myocarditis; heart failure, including chronic heart failure (CHF), cachexia of heart failure; myocardial infarction; restenosis after heart surgery; silent myocardial ischemia; post-implantation complications of left ventricular assist devices; Raynaud's phenomena; thrombophlebitis; vasculitis, including

Kawasaki's vasculitis; giant cell arteritis, Wegener's granulomatosis; and Schoenlein-Henoch purpura.

In addition, TNFR2:Fc or the other crystalline TNFR2 polypeptides disclosed herein may be used in combination with myeloid or angiogenic stem cell therapies for the treatment of cardiovascular disease, including cardiomyopathy of ischemic or non-ischemic origin, post-myocardial infarction angiogenic therapy or treatment for peripheral arterial disease. Stem cells useful for this purpose include mesenchymal stem cells and endothelial precursor cells, such as those found in spleen, fetal liver, bone marrow or circulating blood (United States Patent No. 5,486,359; Deisher T, *Drugs* 3(6):649-53 (2000); Huss R, *Stem Cells* 18:1-9 (2000); Huss et al., *Stem Cells* 18:252-60 (2000)). The crystalline TNFR2 polypeptides may be given concurrently with stem cell transplants as well as treatments with proliferative or differentiative stem cell growth factors.

TNF-alpha and IL-8 have been implicated as chemotactic factors in atherosclerotic abdominal aortic aneurism (Szekanecz et al., *Pathobiol* 62:134-139 (1994)). Abdominal aortic aneurism may be treated in human patients by administering a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc, which may be administered in combination with an inhibitor of IL-8, such treatment having the effect of reducing the pathological neovascularization associated with this condition.

Studies have shown that metalloproteinases (MMPs) are a key element in myocardial remodeling and fibrosis. Thus, administering crystalline TNFR2 polypeptides to inhibit TNF-alpha and the inflammatory response in conjunction with direct inhibition of MMPs will reduce, prevent, or reverse disorders such as left ventricular pump dysfunction. This is accomplished by co-administering a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc, together with an MMP inhibitor. Alternatively, treatment of left ventricular pump dysfunction may involve administering a crystalline TNFR2 polypeptide without the concurrent use of an MMP inhibitor.

Any of the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides or combination treatments disclosed herein also may be used to treat familial combined hyperlipidemia (FCH). FCH is a genetic dyslipidemia characterized by premature coronary heart disease. FCH patients are genetically defective in their TNFR II gene, have low levels of sTNFR II levels in their bodies and appear to be hyperresponsive to the deleterious effects of endogenous TNF-alpha (van Greevenbroek et al., 2000, *Atherosclerosis* 153: 1-8). Coronary heart disease, insulin resistance and obesity associated with FCH can be ameliorated or prevented by administering to FCH patients any one of the crystalline TNFR2 polypeptides disclosed herein, such as crystalline TNFR2:Fc or crystalline etanercept. In addition, crystalline TNFR2 polypeptide treatment for FCH may be administered concurrently with reduction of dietary fat and cholesterol and/or with one or more of the other drugs used to treat this condition, including bile acid-sequestering resins (cholestyramine and colestipol), nicotinic acid, niacin, a cholesterol-lowering drug, such as gemfibrozil or probucol, or one of the cholesterol-lowering "statin" or HMG-CoA reductase inhibitors, such as lovastatin or

pravastatin. In another aspect of the invention, crystalline TNFR2 polypeptides are used to treat patients who have elevated serum levels of C-reactive protein (CRP) and who thus are at risk for heart attack even when their cholesterol may be low (Ridker *et al.*, 2001, *New Eng J Med* 344: 1959-1965).

5 Infections and Injuries

The disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies described herein are useful in medicines for treating bacterial, viral or protozoal infections, and complications resulting therefrom. One such disease is *Mycoplasma pneumoniae*. In addition, provided herein is the use of crystalline TNFR2 polypeptides to treat AIDS and related conditions, such as AIDS dementia complex, AIDS associated wasting, lipidistrophy due to antiretroviral therapy; and Kaposi's sarcoma. Provided herein is the use of crystalline TNFR2 polypeptides for treating protozoal diseases, including malaria (including cerebral malaria) and schistosomiasis. Additionally provided is the use of crystalline TNFR2 polypeptides to treat erythema nodosum leprosum; bacterial or viral meningitis; tuberculosis, including pulmonary tuberculosis; and pneumonitis secondary to a bacterial or viral infection. Provided also herein is the use of crystalline TNFR2 polypeptides to prepare medicaments for treating louse-borne relapsing fevers, such as that caused by *Borrelia recurrentis*. Crystalline TNFR2 polypeptides can also be used to prepare a medicament for treating conditions caused by *Herpes* viruses, such as herpetic stromal keratitis, corneal lesions, and virus-induced corneal disorders. In addition, crystalline TNFR2 polypeptides can be used in treating human papillomavirus infections, as well as in treating infectious mononucleosis. Crystalline TNFR2 polypeptides are used also to prepare medicaments to treat influenza, as well as to treat critical illness polyneuropathy and myopathy (CIPNM), an inflammatory syndrome that occasionally occurs in conjunction with prolonged septic illnesses. The subject crystalline TNFR2 polypeptides are used also to treat transmissible spongiform encephalopathies, which is believed to be mediated by prions.

Another disorder that can be treated with any of the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, pharmaceutical compositions thereof, and/or combination therapies is tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy (TSP/HAM). This disease is caused by infection with the human retrovirus HTLV-1. Recent studies have suggested that TNF-alpha may play a role in the decreased glutamate uptake exhibited by HTLV-infected cells (Szymocha *et al.*, 2000, *J Virol* 74: 6433-6441). TSP/HAM is a slowly progressing condition of the spinal cord that causes weakness and muscle stiffness in the legs, often accompanied by a loss of sensation in the feet. Known treatments for this condition include corticosteroids and plasmapheresis. TSP/HAM may be treated with any of the crystalline TNFR2 polypeptides disclosed herein, any of which may be administered concurrently with a corticosteroid, plasmapheresis, or both. An exemplary crystalline TNFR2 polypeptide for treating TSP/HAM is crystalline TNFR2:Fc. Sufficiency of treatment is determined by monitoring the patient for improvement in leg strength, or an arrest of the patient's deterioration or by any other means deemed appropriate by the patient's physician.

Other conditions treatable by the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies include those resulting from injuries to the head or spinal cord, and including subdural hematoma due to trauma to the head.

Neurologic Disorders, Pain, and Fever

5 Cervicogenic headache is a common form of headache arising from dysfunction in the neck area, and which is associated with elevated levels of TNF-alpha, which are believed to mediate an inflammatory condition that contributes to the patient's discomfort (Martelletti, *Clin Exp Rheumatol* 18(2 Suppl 19):S33-8 (Mar-Apr, 2000)). Cervicogenic headache may be treated by administering crystalline TNFR2 polypeptides as disclosed herein, thereby reducing the
10 inflammatory response and associated headache pain.

In addition, the subject crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies are used to treat chronic pain conditions, such as chronic pelvic pain, including chronic prostatitis/pelvic pain syndrome. As a further example, crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies of the invention are used to treat post-herpetic pain.
15

The crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies of the invention are useful for treating primary amyloidosis. In addition, the secondary amyloidosis that is characteristic of various conditions also are treatable with crystalline TNFR2 polypeptides such as crystalline TNFR2:Fc, and the compositions and/or combination therapies described herein.
20 Such conditions include: Alzheimer's disease, secondary reactive amyloidosis; Down's syndrome; and dialysis-associated amyloidosis. Also treatable with the compounds, compositions, and /or combination therapies of the invention are inherited periodic fever syndromes, including familial Mediterranean fever, hyperimmunoglobulin D and periodic fever syndrome and TNF-receptor associated periodic syndromes (TRAPS).

25 The disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies furthermore are useful for treating acute polyneuropathy; anorexia nervosa; Bell's palsy; chronic fatigue syndrome; transmissible dementia, including Creutzfeld-Jacob disease; demyelinating neuropathy; Guillain-Barre syndrome; vertebral disc disease; Gulf war syndrome; myasthenia gravis; silent cerebral ischemia; sleep disorders, including narcolepsy and sleep apnea;
30 chronic neuronal degeneration; and stroke, including cerebral ischemic diseases.

Oncologic and Hematologic Disorders

Provided herein are methods for using crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies to treat various oncologic and hematologic disorders. For example, crystalline TNFR2 polypeptides are used to treat various forms of cancer, including acute
35 myelogenous leukemia, Epstein-Barr virus-positive nasopharyngeal carcinoma, gall bladder carcinoma, glioma, colon, stomach, prostate, renal cell, cervical and ovarian cancers, lung cancer (SCLC and NSCLC), including cancer-associated nausea, cancer-associated cachexia, fatigue, anorexia, paraneoplastic syndrome of cachexia and hypercalcemia. Additional diseases treatable

with the subject crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies are solid tumors, including sarcoma, osteosarcoma, and carcinoma, such as adenocarcinoma (for example, breast cancer) and squamous cell carcinoma. In addition, the subject compounds, compositions, and/or combination therapies are useful for treating leukemia, including chronic or acute myelogenous leukemia, chronic or acute lymphoblastic leukemia, and hairy cell leukemia. Other malignancies with invasive metastatic potential can be treated with the subject compounds, compositions, and/or combination therapies, including multiple myeloma. When crystalline TNFR2 polypeptides are used to treat a tumor, this treatment may be administered in combination with antibodies targeted to membrane proteins that are expressed at a high level on the particular tumor being treated. For example, tumors such as breast, ovarian, and prostate carcinomas or other Her2-positive tumors, can be administered with crystalline TNFR2:Fc or other crystalline TNFR2 polypeptides in combination with antibodies against Her2/neu, such as HERCEPTIN® (known generically as "trastuzumab;" Genentech, Inc.). Cancer, for example ovarian cancer or prostate cancer, can be treated by concurrent administration of a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc, and interferon- γ (Windbichler *et al.*, 2000, *British J Cancer* 82: 1138-1144).

Various lymphoproliferative disorders also are treatable with the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies. These include, but are not limited to autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), chronic lymphoblastic leukemia, hairy cell leukemia, chronic lymphatic leukemia, peripheral T-cell lymphoma, small lymphocytic lymphoma, mantle cell lymphoma, follicular lymphoma, Burkitt's lymphoma, Epstein-Barr virus-positive T cell lymphoma, histiocytic lymphoma, Hodgkin's disease, diffuse aggressive lymphoma, acute lymphatic leukemias, T gamma lymphoproliferative disease, cutaneous B cell lymphoma, cutaneous T cell lymphoma (i.e., mycosis fungoides) and Sézary syndrome.

In addition, the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies can be used to treat anemias and hematologic disorders, including anemia of chronic disease, aplastic anemia, including Fanconi's aplastic anemia; idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP); myelodysplastic syndromes (including refractory anemia, refractory anemia with ringed sideroblasts, refractory anemia with excess blasts, refractory anemia with excess blasts in transformation); myelofibrosis/myeloid metaplasia; and sickle cell vasocclusive crisis. In addition, crystalline TNFR2 polypeptides, such as crystalline TNFR2:Fc, are useful for treating chronic idiopathic neutropenia.

A combination of a crystalline TNFR2 polypeptide and one or more anti-angiogenesis factors may be used to treat solid tumors, thereby reducing the vascularization that nourishes the tumor tissue. Suitable anti-angiogenic factors for such combination therapies include IL-8 inhibitors, angiostatin, endostatin, krigle 5, inhibitors of vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin-2 or other antagonists of angiopoietin-1, antagonists of platelet-activating

factor, and antagonists of basic fibroblast growth factor. Antibodies against vascular endothelial growth factor, such as the recombinant humanised anti-VEGF (AVASTIN™, known generically as "bevacizumab;" Genentech, Inc.), are useful for combination treatments with crystalline TNFR2 polypeptides such as crystalline TNFR2:Fc.

5 In one embodiment of the invention, the crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc, is administered to cancer patients in combination with a proteasome inhibitor, including administration to patients suffering from hematologic cancers or solid tumors. The proteasome controls the stability of various proteins involved in the cell cycle and apoptosis, such as cyclins and NF-kappaB (see, for example, Schenkstein, 2002, *Clin Lymphoma* 3: 49-55 and
10 Adams, 2002, *Curr Opin Oncol* 14: 628-634). Proteasome inhibitors can induce apoptosis, and thus can sensitize cancer cells to other anti-cancer agents. Exemplary proteasome inhibitors for the subject combinations include, for example, carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (MG132), clasto-lactacystin beta-lactone (A.G. Scientific, Inc.), carbobenzoxy-L-isoleucyl-(gamma)-t-butyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-leucinal (PSI), N-acetyl-leu-leu-norleucinal (ALLN), MLN519 (Millennium
15 Pharmaceuticals), [(1*R*)-3-methyl-1-[[[(2*S*)-1-oxo-3-phenyl-2-[(pyrazinylcarbonyl)amino]propyl]-amino]butyl]boronic acid (PS-341, known generically as "bortezomib;" trade name VELCADE®; Millennium Pharmaceuticals), and carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-norvalinal (MG115; Affiniti Research Products). For example, multiple myeloma, ovarian cancer, prostate cancer, breast cancer, hematologic malignancies, such as lymphoma or leukemia, or other tumors may be treated
20 concurrently with a proteasome inhibitor, such as PS-341, and a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc or crystalline etanercept.

Undesired side effects of certain therapies can be treated with crystalline TNFR2 polypeptides, such as crystalline TNFR2:Fc. Such side effects in some instances are mediated by elevated TNF-alpha levels, thus such patients will benefit from treatment with an agent that reduces
25 levels of TNF-alpha. For example, crystalline TNFR2 polypeptides such as crystalline TNFR2:Fc may be administered to help combat the nausea associated with chemotherapy or other drug-induced nausea. In addition, crystalline TNFR2 polypeptides are used to treat the radiation-induced brain damage associated with radiation treatment for brain tumors. Furthermore, crystalline TNFR2 polypeptides are used to treat the toxicity associated with the administration of
30 monoclonal antibodies directed against antigens present on the surface of particular kinds of cancer cells. For example, the crystalline TNFR2 polypeptides disclosed herein may be used to treat toxicity associated with infusion of CAMPATH 1-H® (known generically as "alemtuzumab;" Berlex Laboratories; see also EP 0328404A1), which is used to treat chronic lymphocytic leukemia. CAMPATH 1-H is a humanized antibody specific for CD52, a cell surface antigen
35 found on monocytes, B cells and T cells. In another embodiment of the invention, the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, such as crystalline TNFR2:Fc or crystalline etanercept, may be

administered to ameliorate the autoimmune response disorder related to long-term interferon treatment.

A crystalline TNFR2 polypeptide can be administered to cancer patients to reduce the undesired side effects associated with long-term interferon administration, which can include fatigue, fever, neutropenia, rash, headaches, digestive disorders, liver enzyme imbalances and so on. For example, interferon γ (IFN γ) has been shown to be active in ovarian cancer, thus a patient with ovarian cancer can be treated by concurrently administering IFN γ and a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc, or crystalline etanercept. Similarly, IFN α is often used to treat melanoma, chronic myelogenous leukemia, basal cell carcinoma, hairy cell leukemia, bladder cancer, hemangiomas of infancy and childhood, multiple myeloma, Kaposi's sarcoma, mycosis fungoides, non-Hodgkin's lymphoma and renal cell carcinoma and can be administered concurrently with a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc, to reduce interferon-induced side effects.

In addition, crystalline TNFR2 polypeptides can be used to prevent development of or alleviate drug resistance to agents that are bound by alpha-1-acid glycoprotein (AGP), a protein that capable of binding to small molecules and that preferentially binds to basic molecules. AGP is an acute phase protein that becomes increased in a variety of pathologic conditions, including chronic inflammation, myocardial infarction and cancer. STI 571 (Glivec®, generically known as "imatinib;" Novartis) is an active inhibitor of Bcr-Abl and C-kit kinase activity, and is useful for treating chronic myelogenous leukemia (CML). A mouse model study of CML has shown that AGP binds and inactivates imatinib, thus resulting in a resistance to this drug (Gambacorti-Passerini *et al.*, 2000, *J Natl Can Inst* 92: 1641-1650). The level of AGP in a patient can be lowered by administering pentoxifylline (Voisin *et al.*, 1998, *Am J Physiol* 275: R1412-R1419). The subject invention provides methods of preventing or reducing resistance to imatinib by concurrently administering a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc or crystalline etanercept, to a CML patient who is undergoing treatment with imatinib. UCN-01 (7-hydroxystaurosporine), an agent used to treat gastrointestinal and other solid tumors, also has a propensity for binding to AGP (Sonderowicz *et al.*, 2000, *J Natl Cancer Inst* 92(5): 376-387; Noriaki *et al.*, 2000, *Biol Pharmac Bull* 23(7): 893-895; Fuse *et al.*, 1999, *Cancer Res* 59(5): 1054-1060; Tamura *et al.*, 1999, *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 18: A611). Provided herein is a method for preventing or reducing UCN-01 binding to AGP by administering a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc, to a gastrointestinal cancer patient who is being treated concurrently with UCN-01, thereby enhancing the effectiveness of the UCN-01 treatment. Alternatively, patients receiving imatinib or UCN-01 can be treated by the concurrent administration of an IL-1 inhibitor or a crystalline TNFR2 polypeptide together with an IL-1 inhibitor, such as one of the IL-1 inhibitors described in WO 01/87328, which is hereby incorporated by reference in its entirety. For these methods, the crystalline TNFR2 polypeptide

may be administered one or more times per week, for example, one, two or three times per week. One suitable mode of administration for the crystalline TNFR2 polypeptide is by subcutaneous injection. When the patient is an adult, suitable doses for injected crystalline TNFR2 polypeptide include 5-12 mg/m² of body surface area, or 25 mg or 50 mg per dose. If the patient is a pediatric patient, the crystalline TNFR2 polypeptide may be administered by subcutaneous injection one or more times per week at a dose of 0.4 mg/kg of body weight, up to a maximum of 25 mg per dose.

Pulmonary Disorders

A number of pulmonary disorders also can be treated with the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies. One such condition is adult respiratory distress syndrome (ARDS), which is associated with elevated TNF-alpha, and may be triggered by a variety of causes, including exposure to toxic chemicals, pancreatitis, trauma or other causes. The disclosed compounds, compositions, and/or combination therapies of the invention also are useful for treating broncho-pulmonary dysplasia (BPD); lymphangioleiomyomatosis; pulmonary hypertension; chronic fibrotic lung disease of preterm infants; and idiopathic bronchiectasis. Idiopathic bronchiectasis is a disease in which neutrophils mediate degradation of the proteoglycan component of the bronchial matrix. Proinflammatory mediators in the bronchial secretions of bronchiectasis patients, particularly TNF-alpha, are suspected of enhancing the degradative action of these neutrophils (Shum et al., *Am J Respir Crit Care Med* 162:1925-31 (2000)). The present invention provides treatment for idiopathic bronchiectasis that comprises administering a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc. In addition, the compounds, compositions, and/or combination therapies of the invention are used to treat occupational lung diseases, including asbestosis, coal worker's pneumoconiosis, silicosis, or similar conditions associated with long-term exposure to fine particles. In other aspects of the invention, the disclosed compounds, compositions, and/or combination therapies are used to treat pulmonary disorders, including chronic obstructive pulmonary disease (COPD) associated with chronic bronchitis or emphysema; fibrotic lung diseases, such as cystic fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis and radiation-induced pulmonary fibrosis; sarcoidosis, including pulmonary sarcoidosis; and allergies, including allergic rhinitis, contact dermatitis, atopic dermatitis, and asthma.

Cystic fibrosis is an inherited condition characterized primarily by the accumulation of thick mucus, predisposing the patient to chronic lung infections and obstruction of the pancreas, which results in malabsorption of nutrients and malnutrition. Crystalline TNFR2 polypeptides may be administered to treat cystic fibrosis. If desired, treatment with crystalline TNFR2 polypeptides may be administered concurrently with corticosteroids, mucus-thinning agents such as inhaled recombinant deoxyribonuclease I (such as PULMOZYME®; Genentech, Inc.) or inhaled tobramycin (TOBI®; Pathogenesis, Inc.). Crystalline TNFR2 polypeptides also may be administered concurrently with corrective gene therapy, drugs that stimulate cystic fibrosis cells to

secrete chloride, or other yet-to-be-discovered treatments. Sufficiency of treatment may be assessed, for example, by observing a decrease in the number of pathogenic organisms in sputum or lung lavage (such as *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*), by monitoring the patient for weight gain, by detecting an increase in lung capacity, or by any other convenient means.

Crystalline TNFR2 polypeptides or crystalline TNFR2 polypeptides combined with the cytokine IFN γ -1b (such as ACTIMMUNE[®]; InterMune Pharmaceuticals) may be used for treating cystic fibrosis or fibrotic lung diseases, such as idiopathic pulmonary fibrosis, radiation-induced pulmonary fibrosis and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. In addition, this combination is useful for treating other diseases characterized by organ fibrosis, including systemic sclerosis (also called "scleroderma"), which often involves fibrosis of the liver. For treating cystic fibrosis, crystalline TNFR2 polypeptide and IFN γ -1b may be combined with PULMOZYME[®] or TOBI[®] or other treatments for cystic fibrosis. Crystalline TNFR2 polypeptide alone or in combination with IFN γ -1b may be administered together with other treatments presently used for treating fibrotic lung disease. Such additional treatments include glucocorticoids, azathioprine, cyclophosphamide, penicillamine, colchicine, supplemental oxygen and so forth. Patients with fibrotic lung disease, such as IPF, often present with nonproductive cough, progressive dyspnea, and show a restrictive ventilatory pattern in pulmonary function tests. Chest radiographs reveal fibrotic accumulations in the patient's lungs. When treating fibrotic lung disease in accord with the disclosed methods, sufficiency of treatment may be detected by observing a decrease in the patient's coughing (when cough is present), or by using standard lung function tests to detect improvements in total lung capacity, vital capacity, residual lung volume, or by administering a arterial blood gas determination measuring desaturation under exercising conditions, and showing that the patient's lung function has improved according to one or more of these measures. In addition, patient improvement may be determined through chest radiography results showing that the progression of fibrosis in the patient's lungs has become arrested or reduced. In addition, crystalline TNFR2 polypeptides are useful for treating organ fibrosis when administered in combination with relaxin, a hormone that down-regulates collagen production thus inhibiting fibrosis, or when given in combination with agents that block the fibrogenic activity of TGF- β . Combination therapies using crystalline TNFR2 polypeptide and recombinant human relaxin are useful, for example, for treating systemic sclerosis or fibrotic lung diseases, including cystic fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, radiation-induced pulmonary fibrosis, and bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

Rheumatic and Skin Disorders

Other embodiments provide methods for using the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies to treat a variety of rheumatic disorders. The use of TNF-alpha inhibitors in treating rheumatoid arthritis is reviewed in Moreland, L.W., 1991, *J Rheumatol* 26 Suppl 57: 7-15, and the use of TNF-alpha inhibitors in treating spondylo-

arthropathy and ankylosing spondylitis is disclosed in Schnarr *et al.*, 2002, *Clin Exp Rheumatol* 20 (Suppl. 28): S126-S129 and in Gorman *et al.*, 2002, *N Engl J Med* 346 (18): 1349-1356, respectively. Conditions that can be treated with crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies include: adult and juvenile rheumatoid arthritis; systemic lupus erythematosus; gout; osteoarthritis; polymyalgia rheumatica; seronegative spondylarthropathies, including ankylosing spondylitis; and Reiter's disease (reactive arthritis). The subject crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies are used also to treat psoriatic arthritis and chronic Lyme arthritis; the use of TNF-alpha inhibitors in treating psoriatic arthritis is described in Ruderman, R.M., 2002, *Am J Manag Care* 8: S171-S180 and in Salvarani *et al.*, 2002, *Clin Exp Rheumatol* 20 (Suppl. 28): S71-S75. Also treatable with these compounds, compositions, and/or combination therapies are Still's disease and uveitis associated with rheumatoid arthritis. In addition, the compounds, compositions, and/or combination therapies of the invention are used in treating disorders resulting in inflammation of the voluntary muscle, including dermatomyositis and polymyositis. Moreover, the compounds, compositions, and/or combinations disclosed herein are useful for treating sporadic inclusion body myositis, as TNF-alpha may play a significant role in the progression of this muscle disease. In addition, the compounds, compositions, and/or combinations disclosed herein are used to treat multicentric reticulohistiocytosis, a disease in which joint destruction and papular nodules of the face and hands are associated with excess production of proinflammatory cytokines by multinucleated giant cells. The crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies of the invention may be used to inhibit hypertrophic scarring, a phenomenon believed to result in part from excessive TNF-alpha secretion. Crystalline TNFR2 polypeptides may be administered alone or concurrently with other agents that inhibit hypertrophic scarring, such as inhibitors of TGF-alpha.

Disorders involving the skin or mucous membranes also are treatable using the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies. Such disorders include acantholytic diseases, including Darier's disease, keratosis follicularis, and pemphigus vulgaris. Also treatable with the subject crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies are acne; acne rosacea; alopecia areata; aphthous stomatitis; bullous pemphigoid; burns; dermatitis herpetiformis; eczema; erythema, including erythema multiforme and erythema multiforme bullosum (Stevens-Johnson syndrome); inflammatory skin disease; lichen planus; linear IgA bullous disease (chronic bullous dermatosis of childhood); loss of skin elasticity; mucosal surface ulcers; neutrophilic dermatitis (Sweet's syndrome); pityriasis rubra pilaris; psoriasis; pyoderma gangrenosum; and toxic epidermal necrolysis.

In another embodiment, the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides are used to treat and prevent the recurrence of lipodermatosclerosis and chronic venous ulcers, which most often are located on the legs. Studies have shown that TNF-alpha may contribute to the pathogenesis of lipodermatosclerosis and chronic venous ulcers by activation of matrix metalloproteinase 2

(MMP2), and by inducing the production of TGF α and other cytokines. Oxpentifylline and pentoxifylline have been shown to be effective in this setting. The disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, including crystalline TNFR2:Fc or crystalline etanercept, may be used to treat chronic venous ulcers either alone or in combination with one or more of oxpentifylline, pentoxifylline, GM-CSF, leptin, PDGF, bFGF, EGF, TGF, and/or IGF. These treatments will accelerate healing and prevent recurrences. Administration may be systemic or local. For local administration, the crystalline TNFR2 polypeptide is applied topically in an ointment, lotion, gel or cream, or is injected perilesionally directly into or within about ten centimeters of the ulcer.

Additional Disorders

Provided also are methods for using crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies to treat various disorders of the endocrine system. For example, the crystalline TNFR2 polypeptides are used to treat juvenile onset diabetes (includes autoimmune and insulin-dependent types of diabetes) and also to treat maturity onset diabetes (includes non-insulin dependent and obesity-mediated diabetes). In addition, the subject compounds, compositions, and/or combination therapies are used to treat secondary conditions associated with diabetes, such as diabetic retinopathy, kidney transplant rejection in diabetic patients, obesity-mediated insulin resistance, and renal failure, which itself may be associated with proteinuria and hypertension. Other endocrine disorders also are treatable with these compounds, compositions, and/or combination therapies, including polycystic ovarian disease, X-linked adrenoleukodystrophy, hypothyroidism, and thyroiditis, including Hashimoto's thyroiditis (i.e., autoimmune thyroiditis).

The disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, such as crystalline TNFR2:Fc, compositions, and/or combination therapies are further used to treat conditions of the liver such as hepatitis, including acute alcoholic hepatitis, acute drug-induced or viral hepatitis, hepatitis A, B and C, sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis, idiopathic portal hypertension, and inflammation of the liver due to unknown causes. The foregoing liver diseases may be treated with a crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc, concurrently with other medications used to treat the same conditions. As an example, crystalline TNFR2 polypeptides may be used to treat hepatitis C, including chronic hepatitis C, in patients who are concurrently treated with interferon-alpha (IFNalpha). High expression of TNF-alpha in the liver interferes with the action of IFNalpha, thus interfering with the patient's response to IFNalpha treatment (Hong *et al.*, 2001, *FASEB J* 15: 1595-1597). Treatments that may be administered concurrently with crystalline TNFR2 polypeptides to treat hepatitis C include pegylated IFNalpha, ribavirin, or a combination of ribavirin and interferon-alpha or pegylated interferon-alpha. Interferon-alpha moieties suitable for concurrent use with crystalline TNFR2 polypeptides include IFNalpha-2a (such as ROFERON®; Hoffmann-LaRoche), pegylated IFNalpha-2a (such as PEGASYS®; Hoffmann-LaRoche), pegylated IFNalpha-2a or -2b as described in US20020127203A1, or the pegylated-IFNalpha conjugates described in WO 9964016. In another embodiment, Hepatitis C

can be treated by concurrent administration of interferon-alpha and a crystalline TNFR2 polypeptide other than crystalline TNFR2:Fc, such as crystalline forms of lenercept or oncept.

Conditions of the gastrointestinal system also are treatable with crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies, including coeliac disease; the use of
5 TNF-alpha inhibitors in treating Crohn's disease is disclosed in Ricart *et al.*, 2002, *Drugs of Today* 38 (11): 725-744. In addition, the compounds, compositions, and/or combination therapies of the invention are used to treat Crohn's disease; nausea associated with gastrointestinal disorders or other systemic disorders; ulcerative colitis; idiopathic gastroparesis; cholelithiasis (gallstones); pancreatitis, including chronic pancreatitis and lung injury associated with acute pancreatitis; and
10 ulcers, including gastric and duodenal ulcers.

Included also are methods for using the subject crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies for treating disorders of the genitourinary system, such as glomerulonephritis, including autoimmune glomerulonephritis, glomerulonephritis due to exposure to toxins or glomerulonephritis secondary to infections with haemolytic streptococci or
15 other infectious agents. Also treatable with the compounds, compositions, and/or combination therapies of the invention are uremic syndrome and its clinical complications (for example, renal failure, anemia, and hypertrophic cardiomyopathy), including uremic syndrome associated with exposure to environmental toxins, drugs, or other causes. Further conditions treatable with the compounds, compositions, and/or combination therapies of the invention are complications of
20 hemodialysis; prostate conditions, including benign prostatic hypertrophy, nonbacterial prostatitis and chronic prostatitis; and complications of hemodialysis.

In addition, the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies are used to treat various disorders that involve hearing loss such as those that are associated with abnormal TNF-alpha expression. One of these is inner ear or cochlear
25 nerve-associated hearing loss that is thought to result from an autoimmune process, i.e., autoimmune hearing loss. This condition currently is treated with steroids, methotrexate and/or cyclophosphamide, which may be administered concurrently with crystalline TNFR2:Fc or other crystalline TNFR2 polypeptide. Also treatable with the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies is cholesteatoma, a middle ear disorder often
30 associated with hearing loss.

In addition, the subject invention provides crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies for the treatment of non-arthritic medical conditions of the bones and joints. This encompasses osteoclast disorders that lead to bone loss, such as but not limited to osteoporosis, including post-menopausal osteoporosis, periodontitis resulting in tooth loosening or
35 loss, and prosthesis loosening after joint replacement (generally associated with an inflammatory response to wear debris). This latter condition also is called "orthopedic implant osteolysis." Other conditions treatable by administering crystalline TNFR2 polypeptides, such as crystalline TNFR2:Fc, include temporal mandibular joint dysfunction (TMJ) and bone loss due to the

hypercalcemia of cancer, including metastases to bone, such as, for example, may occur in melanoma or carcinoma of lung, breast, lung, squamous cell carcinoma, head and neck cancer, renal cancer, or prostate cancer.

Disorders associated with transplantation also are treatable with the disclosed crystalline
5 TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies, such as graft-versus-host disease, and other complications resulting from solid organ transplantation, including transplantation of heart, liver, lung, skin, kidney or other organs. Such crystalline TNFR2 polypeptides may be administered, for example, to prevent or inhibit the development of bronchiolitis obliterans, such as bronchiolitis obliterans after lung transplantation and bronchiolitis
10 obliterans organizing pneumonia. Patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation in the form of peripheral blood stem cell transplantation may develop "engraftment syndrome," or "ES," which is an adverse and generally self-limited response that occurs about the time of hematopoietic engraftment and which can result in pulmonary deterioration. ES may be treated with inhibitors of either IL-8 or TNF-alpha (such as crystalline TNFR2:Fc or other
15 crystalline TNFR2 polypeptides), or with a combination of inhibitors against both of these cytokines. The disclosed crystalline TNFR2 polypeptides also are useful for treating or preventing graft failure, such as bone marrow graft rejection or failure of the recipient's body to accept other types of grafts, such as corneal transplants, or such as liver or other solid organ transplants, in which graft rejection is often accompanied by elevated levels of TNF-alpha and IL-10. Graft
20 rejection may be treated with a combination of a crystalline TNFR2 polypeptide and an IL-10 inhibitor.

Ocular disorders also are treatable with the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies, including rhegmatogenous retinal detachment, and inflammatory eye disease, and inflammatory eye disease associated with smoking as well as
25 macular degeneration associated with smoking or associated with aging.

Crystalline TNFR2 polypeptides such as crystalline TNFR2:Fc, the disclosed compositions, and/or combination therapies described herein are useful for treating disorders that affect the female reproductive system. Examples include, but are not limited to, multiple implant failure/infertility; fetal loss syndrome or IV embryo loss (spontaneous abortion); preeclamptic
30 pregnancies or eclampsia; and endometriosis.

In addition, the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies are useful for treating obesity, including treatment to bring about a decrease in leptin formation, or weight gain associated with the use of anti-depressant medications. Also, the compounds, compositions, and/or combination therapies of the invention are used to treat
35 neurogenic pain, sciatica, symptoms of aging, severe drug reactions (for example, IL-2 toxicity or bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis), or to suppress the inflammatory response prior, during, or after the transfusion of allogeneic red blood cells in cardiac or other surgery, or in treating a traumatic injury to a limb or joint, such as traumatic knee injury. Various other medical

disorders treatable with the disclosed crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies include; multiple sclerosis; Behcet's syndrome; Sjogren's syndrome; autoimmune hemolytic anemia; beta thalassemia; amyotrophic lateral sclerosis (Lou Gehrig's Disease); Parkinson's disease; and tenosynovitis of unknown cause, as well as various autoimmune disorders or diseases associated with hereditary deficiencies. In addition, the subject crystalline TNFR2 polypeptides, compositions, and/or combination therapies are used to treat hereditary conditions such as Gaucher's disease, Huntington's disease, linear IgA disease, and muscular dystrophy.

In yet another embodiment of the invention, the crystalline TNFR2 polypeptides disclosed herein are used to treat autism spectrum disorder and other pervasive developmental disorders. It has been shown that proinflammatory cytokines, including TNF-alpha and IL-1 are overproduced in a subset of autistic patients, indicating that these patients had excessive innate immune responses and/or aberrant production of regulatory cytokines for T cell responses. Thus, provided herein are methods for treating autism spectrum disorder by administering a crystalline TNFR2 polypeptide such as crystalline TNFR2:Fc.

Additional Combination Therapies

Various other medicaments used to treat the diseases described herein may also be administered concurrently with compositions comprising crystalline TNFR2, or compositions prepared using crystalline TNFR2. Such medicaments include: antivirals; antibiotics; analgesics; non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs); disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs); corticosteroids; topical steroids; systemic steroids (e.g., prednisone); cytokines; antagonists of inflammatory cytokines; antibodies against T cell surface proteins; oral retinoids; salicylic acid; and hydroxyurea. Suitable analgesics for such combinations include: acetaminophen, codeine, propoxyphene napsylate, oxycodone hydrochloride, hydrocodone bitartrate, and tramadol. NSAIDs suitable for the subject combination treatments include: salicylic acid (aspirin) and salicylate derivatives; ibuprofen; indomethacin; celecoxib (CELEBREX®); rofecoxib (VIOXX®); valdecoxib (BEXTRA®); ketorolac; nambumstone; piroxicam; naproxen; oxaprozin; sulindac; ketoprofen; diclofenac; and other COX-1 and COX-2 inhibitors, propionic acid derivatives, acetic acid derivatives, fumaric acid derivatives, carboxylic acid derivatives, butyric acid derivatives, oxicams, pyrazoles and pyrazolones, including newly developed anti-inflammatories. DMARDs suitable for such combinations include: azathioprine, cyclophosphamide, cyclosporine, hydroxychloroquine sulfate, methotrexate, leflunomide, minocycline, penicillamine, sulfasalazine, and gold compounds such as oral gold, gold sodium thiomalate, and aurothioglucose. Examples of cytokine inhibitors that can be used in combination with crystalline TNFR2 include, for example, antagonists of TGFβ, of IL-6, or of IL-8. Crystalline TNFR2 polypeptides also may be administered in combination with the cytokines GM-CSF, IL-2,

and/or inhibitors of protein kinase A type 1 to enhance T cell proliferation in HIV-infected patients who are receiving anti-retroviral therapy. In addition, crystalline TNFR2 polypeptides may be combined with inhibitors of IL-13 to treat Hodgkin's disease. Nerve growth factors also can be combined with crystalline TNFR2 polypeptides to treat certain conditions. Such conditions
5 include neurodegenerative diseases, spinal cord injury and multiple sclerosis. Other conditions treatable with this combination are glaucoma and diabetes. In addition, the crystalline TNFR2 polypeptides may be administered in combination with antimalarials or colchicine.

Other compounds suitable for treating the diseases described herein in combination with crystalline TNFR2 polypeptides include small molecules such as thalidomide or thalidomide
10 analogs, pentoxifylline, or matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors or other small molecules. Suitable MMP inhibitors for this purpose include, for example, those described in U.S. Patent Nos. 5,883,131, 5,863,949, and 5,861,510 as well as the mercapto alkyl peptidyl compounds described in U.S. 5,872,146. Other small molecules capable of reducing TNF-alpha production, include, for
15 example, the molecules described in U.S. Patent Nos. 5,508,300, 5,596,013, and 5,563,143, any of which can be administered in combination with crystalline TNFR2 polypeptides. Additional small molecules useful in combination with crystalline TNFR2 polypeptides for treating the diseases described herein include the MMP inhibitors that are described in U.S. 5,747,514, U.S. 5,691,382, as well as the hydroxamic acid derivatives described in U.S. 5,821,262. The diseases described
20 herein also may be treated with combination therapies including small molecules that inhibit phosphodiesterase IV and TNF-alpha production, such as substituted oxime derivatives (WO 96/00215), quinoline sulfonamides (U.S. 5,834,485), aryl furan derivatives (WO 99/18095) and heterobicyclic derivatives (WO 96/01825; GB 2 291 422 A). Also useful in combination with crystalline TNFR2 polypeptides are thiazole derivatives that suppress TNF-alpha and IFN-gamma
(WO 99/15524), as well as xanthine derivatives that suppress TNF-alpha and other
25 proinflammatory cytokines (see, for example, U.S. 5,118,500, U.S. 5,096,906, and U.S. 5,196,430). Additional small molecules useful for treating the hereindescribed conditions concurrently with crystalline TNFR2 polypeptides include those disclosed in U.S. 5,547,979.

Additionally, crystalline TNFR2 polypeptides may be combined with a second TNF-alpha antagonist, including an antibody against TNF-alpha or TNF-alpha receptors, a TNF-alpha-derived
30 peptide that acts as a competitive inhibitor of TNF-alpha (such as those described in U.S. 5,795,859 or U.S. 6,107,273), a soluble TNFR other than an Ig fusion protein, or other molecules that reduce endogenous TNF-alpha levels, such as antisense oligonucleotides or ribozymes that inhibit TNF-alpha production or inhibitors of the TNF-alpha converting enzyme (see e.g., U.S. 5,594,106), or any of the small molecules or TNF-alpha inhibitors that are described
35 above, including pentoxifylline or thalidomide or derivatives thereof. Thalidomide or thalidomide derivatives may be administered concurrently with crystalline TNFR2 polypeptides to treat, for example, hematologic and oncologic disorders. Examples of such disorders, any of which may be

5 treated with crystalline TNFR2 polypeptides alone, include graft-versus-host disease, myelodysplastic syndromes, aplastic anemia, sickle cell vasocclusive crisis, acute myelogenous leukemia (AML), chronic lymphocytic leukemia (CLL), hairy cell leukemia, paraneoplastic syndromes of cachexia and hypercalcemia, multiple myeloma and POEMS syndrome (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, and skin changes), myelofibrosis/myeloid metaplasia, Kaposi's sarcoma, cachexia associated with cancer, amyloidosis, anemia of chronic disease, squamous cell carcinoma, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), autoimmune hemolytic anemia, and beta thalassemia. In one embodiment of the invention, the crystalline TNFR2 polypeptide used in combination with
10 thalidomide is crystalline TNFR2:Fc or crystalline etanercept.

In addition, the subject invention provides methods for treating a human patient in need thereof, the method involving administering to the patient a therapeutically effective amount of a crystalline TNFR2 polypeptide and an IL-4 inhibitor, as described in US 2001/0021380 A1, which is incorporated by reference in its entirety herein. Conditions effectively treated by a combination
15 of a crystalline TNFR2 polypeptide and an IL-4 inhibitor include asthma, chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary alveolar proteinosis, bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis, radiation-induced pulmonary fibrosis, cystic fibrosis, collagen accumulation in the lungs, ARDS; various skin disorders, including but not limited to dermatitis herpetiformis (Dühring's disease), atopic dermatitis, contact dermatitis, urticaria (including chronic idiopathic urticaria), and autoimmune blistering diseases, including pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid; myasthenia
20 gravis, sarcoidosis, including pulmonary sarcoidosis, scleroderma, reactive arthritis, hyper IgE syndrome, multiple sclerosis, and idiopathic hypereosinophil syndrome; allergic reactions to medication, and as an adjuvant to allergy immunotherapy. In certain embodiments, combinations of crystalline TNFR2 polypeptides and IL-4 inhibitors are administered one or more times per
25 week by subcutaneous injection or by aerosol pulmonary administration, for example by nebulizer.

Other treatments for the herein-described diseases include administering crystalline TNFR2 polypeptides concurrently with compounds that block the binding of RANK and RANK-ligand, such as antagonistic antibodies against RANK or RANK-ligand, osteoprotegerin or soluble forms of RANK, including RANK:Fc, and soluble forms of RANK-ligand that do not
30 trigger RANK. In one embodiment of the invention, antibodies that specifically bind human RANKL are administered concurrently with crystalline TNFR2 polypeptide, such as crystalline TNFR2:Fc. Soluble forms of RANK suitable for these combinations are described, for example, in U.S. 6,017,729. The concurrent administration of crystalline TNFR2 polypeptides together with RANK:Fc or osteoprotegerin is useful for preventing bone destruction in various settings including
35 but not limited to osteoporosis, multiple myeloma or other malignancies that cause bone degeneration, or anti-tumor therapy aimed at preventing metastasis to bone, or bone destruction associated with prosthesis wear debris or with periodontitis. Tumors that are treatable with a combination of a crystalline TNFR2 polypeptide and a RANK inhibitor include breast cancer, lung

cancer, melanoma, bone cancer, squamous cell carcinoma, head and neck cancer, renal cancer, prostate cancer, and cancers associated with hypercalcemia.

Additional Uses

Transfection of lymphocytes with non-viral vectors can lead to apoptosis of the target cells through a TNF-alpha and CD95-mediated pathway (see, for example, Ebert et al., *Cytokines, Cell & Mol Ther* 5:165-73 (1999)). Crystalline TNFR2 polypeptides, such as crystalline TNFR2-Fc, may be used alone or in combination with a CD95 inhibitor, such as an antibody against CD95, to inhibit this apoptosis. This treatment will augment gene transfer to lymphocytes when non-viral vectors are used, particularly when liposome-mediated or receptor-mediated gene transfer methods are used. Such treatment will improve the incorporation of the exogenous gene into the target cells.

In addition, the present compositions may also be used for manufacture of one or more medicaments for treatment or amelioration of the conditions the crystalline TNFR2 polypeptide is intended to treat.

The following examples are offered to more fully illustrate the invention, but are not to be construed as limiting the scope thereof.

Example 1

Method for the Crystallization of ENBREL® (etanercept)

Etanercept polypeptide consists of a portion of the extracellular domain of human tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR p75) fused to a portion of human immunoglobulin G1 (IgG1), as described above. Etanercept polypeptide was prepared by expressing DNA construct encoding etanercept in mammalian host cells and then was purified to substantial homogeneity. For the following crystallization experiments, the etanercept polypeptide was suspended in a phosphate buffer.

Crystallization of etanercept was achieved using a crystallization screen (PEG/LiCl Grid Screen; Hampton Research, Aliso Viejo, CA), which employs a method for crystallization of macromolecules known as 'hanging drop' vapor diffusion. A drop composed of a mixture of the polypeptide sample and the crystallization reagent (the "crystallization buffer" or the "mother liquor") is deposited on the underside of a slanted coverlip, and then the drop on the coverlip is sealed with grease and placed over typically a 24 well VDX tray causing a vapor equilibrium with a liquid reservoir of reagent. To achieve equilibrium, water vapor exchanges between the drop and a one milliliter reservoir solution in the well of the tray. As water leaves the drop, the polypeptide sample undergoes an increase in relative concentration which may eventually lead to supersaturation. It is the increased concentration of the polypeptide sample that is required for crystallization to take place. Typically the drop contains a lower concentration of reagent than the reservoir, and typically, the drop contained half the concentration of reagent in the reservoir,

because equal volumes of sample and reagent were mixed to form the drop. In these experiments, the initial polypeptide concentration in the drop was usually 25.48 mg/mL or 50.96mg/mL, but crystallization was also observed at etanercept polypeptide concentrations of approximately 6 mg/mL and may be obtained at higher concentrations such as 100 mg/mL, or at lower concentrations of polypeptide such as approximately 3 mg/mL, but at lower concentrations, incubation for longer times may be required for crystal growth, depending on the size of the initial drop.

The crystallization screen was set up in 24-well VDX polypropylene tissue culture trays. Each position in the VDX tray contained 1 mL of reagent reservoir, with the reagent reservoir in each well differing in composition from that in the other wells, to establish an array of differing crystallization buffer conditions. One microliter of polypeptide solution at each polypeptide concentration was added to 1 microliter of reservoir solution to form the drops. Trays were incubated either at 5 ± 3 degrees C or at ambient room temperature (20 ± 3 degrees C). Crystals appeared in approximately 48 hours in some of the wells incubated at ambient room temperature, and continued to grow over subsequent days.

In the initial screens, crystals were obtained in the following conditions, using either an etanercept concentration of 25.48 mg/mL or a concentration of 50.96 mg/mL:

1. 1.0M lithium chloride, 0.1M HEPES pH 7.0; 30% polyethylene glycol 6000
2. 1.0M lithium chloride, 0.1M Tris-HCl pH 8.0; 30% polyethylene glycol 6000
3. 1.0M lithium chloride, 0.1M Bicine pH 9.0; 30% polyethylene glycol 6000
4. 0.2M lithium sulfate, 0.1M Tris-HCl pH 8.5, 30% polyethylene glycol 4000
5. 0.2M lithium sulfate, 0.1M Tris-HCl pH 8.5, 25% polyethylene glycol 3350
6. 0.5M lithium sulfate, 0.1M Tris-HCl pH 8.5

The etanercept crystals formed under the first three conditions above were rods or rod clusters approximately 1 mm in length, and were often accompanied by an amorphous precipitant. The etanercept crystals formed in the lithium sulfate conditions were rods approximately 0.1 – 0.2 mm in length, and were produced without the amorphous precipitate seen in the lithium chloride conditions. Some of the etanercept crystals were tested by X-ray diffraction and did not show a salt-like diffraction pattern, a result consistent with the crystals containing polypeptide material. Some of the etanercept crystals were solubilized and their polypeptide content was partially sequenced by seven cycles of automated Edman degradation; a 3-4 pmol partial amino acid sequence was obtained from these crystals and was confirmed to match the N-terminal portion of the etanercept sequence (LPAQVAF; see amino acids 1 through 7 of SEQ ID NO:4). Figure 1 is a photograph of etanercept crystals formed from a polypeptide solution containing 50.96 mg of etanercept per milliliter, with a crystallization reservoir buffer of 0.1M HEPES pH 7.0, 30% PEG 6000, 0.7M lithium chloride; after seven days at ambient room temperature the crystals were harvested manually, extensively washed in the above reservoir buffer, and the photograph was

taken. Crystals from this group were submitted for the N-terminal amino acid sequence analysis described above. Another crystallization condition – 1M lithium sulfate, 0.1M Tris-HCl pH 8.5, 0.01M nickel chloride – produced crystals; however, the polypeptide content of these crystals was not confirmed and therefore under this particular combination of conditions salt crystals are thought to have formed.

Based on these results, each of the three parameters of the first three conditions above (LiCl concentration, pH, and polyethylene glycol (PEG) 6000 concentration expressed as % (weight/volume)) was varied in additional experiments, which resulted in crystals forming in every drop in the additional experimental trays. Lithium chloride concentrations between 0.7M and 1.2M, PEG 6000 concentrations between 22% and 32%, and 0.1M HEPES pH values between pH 6.8 and 7.3 all resulted in successful crystallization in approximately 48 hours at ambient room temperature, at etanercept concentrations of 25.48 and 50.96 mg/mL. Further experiments expanded the range of successful crystallization conditions to include 0.2M through 1.2M LiCl, and 16% through 32% PEG 6000, although crystallization of etanercept may not occur at every combination of conditions which includes 0.2M LiCl, and/or etanercept crystals may take longer to form when 0.2M LiCl is used. Therefore, all combinations of the following conditions – lithium chloride concentrations between 0.3M and 1.2M, PEG 6000 concentrations between 16% and 32%, and 0.1M HEPES pH values between pH 6.8 and 7.3 – are considered to be suitable conditions for crystallization of etanercept. In addition, conditions containing between 0.2M and 0.5M lithium sulfate, 0.1M Tris-HCl at approximately pH 8.5, and optionally including up to 30% PEG in the size range of PEG 3350 – PEG 4000, are considered to be suitable conditions for crystallization of etanercept.

Example 2

Additional Methods for the Crystallization of ENBREL® (etanercept)

The "hanging-drop" method of crystallization, as described in Example 1 above, was used to prepare additional crystals of etanercept. Etanercept was reconstituted from commercially available ENBREL® lyophilized powder as per product instructions: a vial of ENBREL® lyophilized powder contains 25 mg etanercept, 40 mg mannitol, 10 mg sucrose, and 1.2 mg tromethamine, which is reconstituted with 1mL of Sterile Bacteriostatic Water for Injection, USP (containing 0.9% benzyl alcohol). The reconstituted etanercept solution was dialyzed into water using a 10,000 molecular weight cut off dialysis cassette, and then concentrated to 100 mg/mL using a 10,000 molecular weight cut off centrifugal filter. Each crystallization well contained 1.0 mL of a particular crystallization reagent, as listed below, in the reservoir. Drops were made by adding 1 microliter of the 100 mg/mL solution of etanercept to 1 microliter of that crystallization reagent. Crystals were grown at ambient room temperature (approximately 22 degrees C); needle-like crystals of etanercept about 100 micrometers in length formed in all of the crystallization

reagents listed below, in some cases in as few as two days, and in other cases over a period of two to four weeks.

Salt Condition:	Buffer Condition:	2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) Condition:
0.09M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.5	40.28% MPD
0.10M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.0	37.82% MPD
0.10M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 5.0	35.11% MPD
0.08M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 5.0	41.83% MPD
0.12M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.0	31.30% MPD
0.15M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 5.0	43.82% MPD
0.11M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.0	30.55% MPD
0.04M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 5.0	45.75% MPD
0.19M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.0	30.78% MPD
0.14M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.0	37.13% MPD
0.16M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.0	31.27% MPD
0.23M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.0	41.87% MPD
0.18M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.5	34.10% MPD
0.09M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.0	46.00% MPD
0.09M ammonium phosphate	0.10M sodium acetate, pH 4.5	46.01% MPD
0.09M ammonium phosphate	0.10M HEPES, pH 7.5	33.92% MPD
0.20M ammonium phosphate	0.10M Tris, pH 8.5	50.0% MPD

- 5 In additional crystallization experiments, needle-like crystals of etanercept about 100 micrometers in length formed over a period of two to four weeks under the following crystallization conditions:

Salt Condition:	Buffer Condition:	PEG Condition:	Temperature:
1.0M di-ammonium hydrogen phosphate; 0.2M sodium chloride	0.1M imidazole, pH 8.0	-	approximately 22 degrees C
1.0M di-ammonium hydrogen phosphate	0.1M imidazole, pH 8.0	-	approximately 22 degrees C
0.2M sodium chloride	0.1M CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid), pH 10.5	20% PEG 8000	2 - 8 degrees C

Example 3

10

Further Expansion of Crystallization Conditions

Vapor-diffusion crystallization methods, such as the "hanging drop" method described for crystallization of etanercept in Example 1 above, can be varied in order to achieve crystallization of polypeptides such as TNFR2 polypeptides. For example, other volumes of polypeptide sample

relative to reagent can be mixed to vary the difference in reagent concentration between the drop and the reservoir, and also the initial polypeptide concentration in the drop. Mixing one part reagent to nine parts polypeptide sample would produce a drop with an initial concentration of reagent that is 0.1 times that of the reagent concentration of the reservoir. In certain embodiments of the invention, the initial concentration of crystallization reagent in the drop is approximately 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.7, 0.8, 0.85, 0.9, or 0.95 times that of the concentration of crystallization reagent in the reservoir. The initial polypeptide concentration in the drop can be at least as low as approximately 6 mg/mL and at least as high as 100 mg/mL and possibly as high as 120 mg/mL; lower concentrations of polypeptide such as 3 mg/mL may form crystals, but can require longer incubation times before crystals can be detected.

Further expansion of the crystallization conditions may yield additional conditions that are appropriate for obtaining crystals of etanercept or other TNFR2 polypeptides, as described below. For example, combinations can be made of a salt condition, a pH buffer condition, an optional PEG condition, and an optional cofactor condition, wherein each condition is selected from the corresponding group of conditions described below.

	Value Ranges; Minimum (selected from below) to Maximum (selected from below)		
	Minimum Values:	Maximum Values:	Examples of Specific Values:
Salt conditions:			
Lithium chloride	0.05M or 0.1M	1.5M, 2.0M, or 5.0M	0.5M, 0.7M, 1.0M, 1.2M
Lithium sulfate	0.05M or 0.1M	1.0M, 2.0M, or 5.0M	0.2M, 0.35M, 0.5M
Sodium chloride, potassium chloride, ammonium phosphate, sodium phosphate, potassium phosphate, sodium citrate, potassium citrate, ammonium acetate, sodium acetate, ammonium sulfate, magnesium sulfate, or sodium sulfate	0.01M, 0.025M, 0.05M, 0.1M, or 0.5M	1.0M, 1.5M, 2.0M, 2.5M, or 5.0M	0.1M, 0.2M, 0.35M, 0.5M, 0.75M, 1.0M, 1.5M
di-ammonium hydrogen phosphate	0.1M, 0.5M	1.5M, 2.0M	1.0M
pH buffer conditions:			
0.05M, 0.1M, or 0.15M HEPES	pH 4.0, 5.0, or 6.0	pH 8.0, 8.5, or 9.0	pH 6.5, 6.75, 6.9, 7.0, 7.25, 7.5, 7.75
0.05M, 0.1M, or 0.15M Tris-HCl	pH 5.0, 6.0, or 7.0	pH 9.0, 9.5, or 10.0	pH 7.25, 7.5, 7.75, 8.0, 8.25, 8.5, 8.75
0.05M, 0.1M, or 0.15M Bicine	pH 5.0, 6.0, or 7.0	pH 10.0, 10.5, or 11.0	pH 8.0, 8.25, 8.5, 8.75, 9.0, 9.25, 9.5
0.05M, 0.1M, or 0.15M sodium acetate	pH 4.0	pH 5.0	pH 4.0, 4.5, 5.0
0.05M, 0.1M, or 0.15M imidazole	pH 7.5	pH 8.5	pH 8.0

0.1M CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid), pH 10.5	pH 9.0, pH 9.5	pH 11.5, pH 12.0	pH 10.0, pH 10.5, pH 11.0
<u>PEG or 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) conditions:</u>			
Polyethylene glycol (PEG) 200, 300, 400, 600, 750, 900, 1000, 1450, 3350, 4000, 4500, 6000, or 8000	0, 1, 2, 3, 5, or 7.5% (liquid: v/v; solid: w/v)	32, 35, 40, 45, or 50% (liquid: v/v; solid: w/v)	10, 12, 15, 20, 25, 30% (liquid: v/v; solid: w/v)
2-Methyl-2,4-pentanediol (MPD)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, or 8% (v/v)	40, 45, 50, 60, or 70% (v/v)	10, 12, 15, 20, 25, 30, 32, 35% (v/v)
<u>Metal Ion ("Cofactor") conditions:</u>			
nickel chloride	0.001M or 0.005M	0.02M, 0.05M, 0.1M, or 0.2M	0.01M
compounds of the following metals: zinc, copper, calcium, manganese, and magnesium	0.001M, 0.002M, or 0.003M	0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.5M, 1.0M, or 2.0M	0.005M, 0.01M, 0.02M

Example 4 Testing Properties of Crystalline Polypeptides

After polypeptide crystals are formed, they can be subjected to various analyses to confirm their polypeptide content and to further examine their physical structure. For example, if necessary individual crystals can be removed from the crystallization solution and washed with aqueous or organic solvents or additives, then dried (for example, by air drying, by passing a stream of inert gas over the crystal, by lyophilization, or by vacuum). Crystals can be isolated, removed from the crystal growth drop, and then mounted for X-ray diffraction.

As another example, polypeptide crystals can be removed from crystallization solution and washed or rinsed, or the majority of crystallization solution can be removed from the crystals and replaced with a different solution. In this way, the particular salt that was using in the crystallization procedure can be replaced in the crystal lattice with a different salt. In one embodiment of the invention, crystallized TNFR2 polypeptides such as crystalline etanercept are separated from the crystallization buffer and placed in a solution containing a salt of sodium, potassium, or magnesium (for example, sodium acetate, sodium chloride, sodium citrate, sodium phosphate, sodium sulfate, potassium chloride, potassium citrate, or magnesium sulfate). For X-ray diffraction, the replacement solution can contain heavy atoms useful in determining the atomic coordinates of the crystallized polypeptide. As a further embodiment, TNFR2 polypeptides can be cocrystallized with their ligand, for example etanercept can be cocrystallized with TNF-alpha, for determination of the detailed structure of the TNFR-ligand interaction.

In a further example, polypeptide crystals can be removed from crystallization solution and solubilized in an appropriate buffer for further testing, such as an SDS-containing buffer for analysis of the polypeptide that had been crystallized by gel electrophoresis. Methods for analysis of proteins by gel electrophoresis are well known and include staining a gel with silver or

Coomassie blue dye, and comparing the electrophoretic migration of the polypeptide that had been crystallized with the migration of polypeptide markers of known molecular weight. In another method, the polypeptide is visualized in the gel by use of a labeled antibody that specifically binds to the polypeptide. Polypeptides that have been crystallized can also be solubilized in buffers appropriate for amino acid sequencing by Edman degradation, for mass spectrometry, for other spectrographic scattering, refraction, diffraction, or absorption studies, or for labeling of the polypeptide by attachment of a label molecule to the polypeptide.

Example 5

10 Assay of Protein Content of EBNREL[®] (etanercept) Crystal

The "hanging-drop" method of crystallization, as described in Example 1 above, was used to prepare additional crystals of etanercept. Each well contained 100 microliters of the crystallization reagent in the reservoir; the crystallization reagent in this experiment was 0.2M ammonium acetate, 0.1M Tris pH 8.5, and 45% 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD). Etanercept was placed into a solution containing 25mM sodium phosphate pH 6.3, 100 mM NaCl, then concentrated to 29 - 30 mg/mL, for example, to 29.6 mg/mL. Drops were made by adding 1 microliter of this 29 mg/mL solution of etanercept to 1 microliter of the crystallization reagent, for a final etanercept concentration in the drop of approximately 14.5 - 15 mg/mL. The final concentration of the etanercept in the drop was found to be an important factor in achieving crystallization under these particular crystallization conditions, with a final etanercept concentration of approximately 15 mg/mL being effective for crystallization in repeated experiments, while final concentrations of less than 10 mg/mL or greater than 25 mg/mL were not effective. The drops were allowed to vapor exchange with the reagent in the reservoir for approximately one to three weeks at ambient room temperature (20 ± 3 degrees C). Crystals, usually as two to four independent nucleations per drop, formed and appeared as multibranched or dendritic structures with numerous projections or branches off of the main structure. The overall dimensions of each intact branch were approximately 50 micrometers in length from the nucleation center, approximately 30 micrometers in width, and approximately 10 micrometers in thickness or depth. One of the branches was removed from the crystal with a nylon loop, washed with the above crystallization reagent in three serial washes, solubilized in 4XSDS Laemmli buffer, and then placed in the well of an SDS-polyacrylamide gel and subjected to electrophoresis. Following the electrophoresis the gel was stained with silver, and there is a clearly visible silver-stained band in the lane run from the crystallized protein that migrated to the same extent as protein from the etanercept preparation used to produce the crystal. This SDS-polyacrylamide gel electrophoresis assay was repeated using other branches from crystals produced in these experiments, and staining of a band of solubilized crystalline material, with the same electrophoretic migration as etanercept, was also achieved using Coomassie Blue stain. Therefore, the crystals that formed from the

etanercept solution contain material that is apparently etanercept, because it migrates in an SDS-polyacrylamide gel and produces a protein band in the gel in the same fashion that a known sample of etanercept protein does.

5

Example 6 Testing Biological Activity of Crystallized Polypeptides

As described in the example above, polypeptide crystals can be recovered from the crystallization solution, optionally placed in a different solution, washed, and/or dried to remove crystallization buffer, and then solubilized in an appropriate solution for further assays. The biological activities of TNFR2 polypeptides can be tested using any of a number of assays, for example binding assays to determine the ability of previously crystallized TNFR2 (i.e. reconstituted TNFR2 polypeptide) to bind to its ligand. The following examples illustrate assays for measuring the biological activity of those TNFR2 polypeptides that bind TNF-alpha, such as etanercept (see for example Mohler *et al.*, 1993, *J Immunol* 151: 1548-1561), but those of skill in the art will recognize that such assays can be modified for use in measuring the biological activities of other TNFR2 polypeptides.

Binding Competition Assay

Labeled human TNF-alpha such as [¹²⁵I]TNF-alpha at 0.5 nM is incubated in binding medium (RPMI 1640, 2.5% BSA, 50mM HEPES pH 7.4, 0.4% NaN₃) for two hours at 4 degrees C with serially diluted competitive binding agents (for example etanercept reconstituted from crystalline form, or another TNF-alpha-binding TNFR2 polypeptide that has been reconstituted from crystalline form, or unlabeled human TNF-alpha, or uncrystallized etanercept as a control) and 2x10⁶ U937 cells. Duplicate aliquots are subsequently removed, centrifuged through a phthalate oil mixture to separate free and bound ligand, and the radioactivity (cell-bound [¹²⁵I]TNF-alpha) is measured using a gamma counter. Nonspecific binding values are determined by inclusion of a 200x molar excess of unlabeled TNF-alpha and were subtracted from total binding data to yield specific binding values (see for example Park *et al.*, 1990, *J Exp Med* 171: 1073-1089).

Rescue from LPS-Induced Mortality

Injection of a lethal dose of LPS (lipopolysaccharide) raises serum TNF-alpha levels in mice, causing mortality if a sufficient amount of an agent that neutralizes the effects of TNF-alpha is not also administered (see for example Mohler *et al.*, 1993, *J Immunol* 151: 1548-1561). LPS, such as bacterial LPS derived from *E. coli*, is resuspended at 10 mg/mL in sterile saline and stored at -20 degrees C in small aliquots. The LPS is diluted to the proper concentration and sonicated for one minute before injection. Mice such as BALB/c female mice (18 to 20g) are injected intravenously with an LD60 to LD100 dose of LPS (300 to 400 micrograms) in 0.2 mL of saline. The LPS is injected either alone or in conjunction with etanercept reconstituted from crystalline form, or another TNF-alpha-binding TNFR2 polypeptide that has been reconstituted from crystalline form,

or control proteins such as uncrystallized etanercept or human IgG. Survival is monitored for at least 5 days. The presence of active reconstituted TNF-alpha-binding TNFR2 polypeptide is indicated by increased survival of LPS-injected mice, when a sufficient amount of the reconstituted TNF-alpha-binding TNFR2 polypeptide is administered.

- 5 The present invention has been described in terms of particular embodiments found or proposed to comprise certain modes for the practice of the invention. It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that, in light of the present disclosure, numerous modifications and changes can be made in the particular embodiments exemplified without departing from the intended scope of the invention.

10

Sequences Presented in the Sequence Listing

SEQ ID NO	Type	Description
SEQ ID NO:1	Amino acid	Human tumor necrosis factor receptor 2; (TNFR2, p75, CD120b, TNFRSF1B); Swiss-Prot Database Accession No. P20333
SEQ ID NO:2	Amino acid	Human immunoglobulin gamma-1 chain constant region (IgG1; Swiss-Prot Database Accession No. P01857)
SEQ ID NO:3	Amino acid	Variant of human immunoglobulin gamma-1 chain constant region (SEQ ID NO:2 with Asp239->Glu; Leu241->Met)
SEQ ID NO:4	Amino acid	Etanercept

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A crystal of etanercept.
5
2. A crystal of etanercept as in claim 1, wherein the crystal is in the form of a rod.
3. A crystal of etanercept as in claim 1, wherein the crystal has a maximum length of between 0.5 millimeters and 1.5 millimeters.
10
4. A crystal of etanercept as in claim 1, wherein the crystal has a maximum length of between 0.05 millimeters and 0.3 millimeters.
5. A crystal of etanercept as in claim 1, wherein the crystal comprises a salt selected from the
15 group consisting of ammonium acetate, ammonium phosphate, ammonium sulfate, di-ammonium hydrogen phosphate, lithium chloride, lithium sulfate, magnesium sulfate, potassium chloride, potassium citrate, potassium phosphate, sodium acetate, sodium chloride, sodium citrate, sodium phosphate, and sodium sulfate.
- 20 6. A crystal of etanercept as in claim 1, wherein the crystal comprises a salt selected from the group consisting of ammonium acetate, ammonium phosphate, di-ammonium hydrogen phosphate, and sodium chloride.
- 25 7. A method of making a crystal of etanercept, wherein the method comprises combining a solution of etanercept polypeptide with a crystallization buffer comprising a salt.
8. The method of claim 7, wherein the combination is placed in vapor equilibrium with a reservoir of crystallization buffer.
- 30 9. The method of claim 7, wherein the crystallization buffer has a pH between 4.0 and 10.5.
10. The method of claim 7, wherein the salt is selected from the group consisting of ammonium acetate, ammonium phosphate, ammonium sulfate, di-ammonium hydrogen phosphate, lithium chloride, lithium sulfate, magnesium sulfate, potassium chloride, potassium citrate,
35 potassium phosphate, sodium acetate, sodium chloride, sodium citrate, sodium phosphate, and sodium sulfate.

11. The method of claim 7, wherein the concentration of salt in the crystallization buffer is between 0.04M and 1.2M.
12. The method of claim 7, wherein the crystallization buffer further includes 2-methyl-2,4-
5 pentanediol (MPD) or polyoxyethylene glycol (PEG).
13. The method of claim 7, further comprising removing at least a portion of the crystallization buffer after crystals have formed.
- 10 14. The method of claim 13 wherein the portion of crystallization buffer is removed by centrifugation.
15. The method of claim 13, wherein the crystals are placed in a solution containing an organic additive.
- 15 16. The method of claim 13, further comprising the addition of an excipient.
17. The method of claim 16 wherein the excipient is selected from the group consisting of sucrose, trehalose, or sorbitol.
- 20 18. The method of claim 15 wherein the organic additive is ethanol or isopropanol.
19. The method of claim 7, further comprising drying crystals that have formed.
- 25 20. The method of claim 19 wherein the crystals are dried by exposure to air, or by exposure to a vacuum, or by exposure to nitrogen gas.
21. An etanercept crystal produced by the method of any of claims 7 through 20.
- 30 22. A composition comprising etanercept in crystalline form.
23. A composition produced by reconstituting crystalline etanercept.
24. Use of an etanercept crystal as in any of claims 1-21 or a composition as in any of claims
35 22-23 in the preparation of a medicament.
25. The use of claim 24 wherein the medicament is for treating a condition characterized by excessive TNF-alpha levels.

WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

26. The use of claim 25 wherein the medicament reduces levels of TNF-alpha in the serum or tissues of the subject.

- 5 27. The use of claim 25 wherein the condition is rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, psoriasis, or ankylosing spondylitis.

Figure 1



WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN, Inc.
OSSLUND, Timothy D.
CLOGSTON, Christi
CRAMPTON, Shon
BASS, Randal

<120> CRYSTALLINE POLYPEPTIDES

<130> A-859

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240

WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
245 250 255

Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
260 265 270

Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
275 280 285

Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
290 295 300

Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
305 310 315 320

Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
325 330 335

Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
340 345 350

Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
355 360 365

Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
370 375 380

Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
385 390 395 400

WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
 405 410 415

Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
 420 425 430

Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
 435 440 445

Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
 450 455 460

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 3
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

35

40

45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

WO 2003/012353

PCT/US2004/024738

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 4

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fusion polypeptide

WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

<400> 4

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
 20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
 35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
 50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
 65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
 85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
 100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
 115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
 130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
 145 150 155 160

WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
 165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
 180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
 195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
 210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

WO 2005/012353

PCT/US2004/024738

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2004/024738

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C07K14/715 A61K9/14 A61K9/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCALLON BERNIE ET AL: "Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists" JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 301, no. 2, May 2002 (2002-05), pages 418-426, XP002307181 ISSN: 0022-3565 the whole document	1-27
Y	JEN ANNA ET AL: "Diamonds in the rough: Protein crystals from a formulation perspective" PHARMACEUTICAL RESEARCH (NEW YORK), vol. 18, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 1483-1488, XP002307178 ISSN: 0724-8741 the whole document	1-27
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 November 2004		07/01/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentplan 2 NL - 8280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wimmer, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2004/024738

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2004/024738

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANG MARK X ET AL: "Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 100, no. 12, 10 June 2003 (2003-06-10), pages 6934-6939, XP002307180 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-27
A	PARK YOUNG CHUL ET AL: "Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2" NATURE (LONDON), vol. 398, no. 6727, 8 Apr 11 1999 (1999-04-08), pages 533-538, XP002307179 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-27
T	GOFFE BEN ET AL: "Etanercept: An overview." JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY. AUG 2003, vol. 49, no. 2 Suppl, August 2003 (2003-08), pages S105-S111, XP009040453 ISSN: 0190-9622 the whole document	1-27

POLIPÉPTIDOS CRISTALINOS DEL RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE
NECROSIS DE TUMOR

Esta solicitud reivindica el beneficio bajo la solicitud provisional 35 C.F.R 119(e) de los Estados Unidos serie No.60/491,827, presentada en Agosto 1, 2003, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Muchas moléculas terapéuticas son polipéptidos, algunos de los cuales son propensos a la desnaturalización, degradación y/o agregación. La agregación de los polipéptidos es indeseable en la medida en que esta pueda dar como resultado inmunogenicidad (Clean et al., *Crit Rev Therapeutic Drugs Carrier Systems*, 10: 307-377; and Robbins et al., 1987, *Diabetes*, 36: 838-845). Los polipéptidos también se someten a catálisis o a conversión en formas inactivas mediante procesos biológicos naturales de los organismos a los cuales ellos se administran. Adicionalmente, los polipéptidos terapéuticos se pueden producir como una mezcla heterogénea de formas, que varían en la proporción de la glicosilación o en otros aspectos de su conformación tridimensional.

. 000081

La cristalización de los polipéptidos terapéuticos suministra una ventaja para producir una formulación estable y homogénea de tales polipéptidos. Ciertas ventajas de los cristales incluyen mayor facilidad de manejo del compuesto terapéutico para preparar los productos farmacéuticos; degradación reducida, desnaturalización y/o agregación; el potencial de crear una forma de liberación sostenida del polipéptido terapéutico para reducir la frecuencia de la dosificación; y la capacidad de utilizar polipéptidos terapéuticos cristalinos para formar una composición farmacéutica que tiene una muy alta concentración del polipéptido terapéutico. Además, los métodos de cristalización pueden producir una población más homogénea de polipéptidos en la formulación, en razón a que solamente la adición de moléculas de polipéptidos similarmente configuradas le agregará un crecimiento sostenido del cristal - cuando una cantidad limitante de polipéptidos de estructura variante se han incorporado en la red de cristal, la debilidad estructural resultante en el cristal evitará su crecimiento adicional. En razón a que la incorporación en la forma cristalina puede asegurar que un mayor porcentaje del polipéptido esté en una forma activa, la administración de una cantidad más pequeña de los péptidos terapéuticos cristalinos puede producir un efecto terapéutico equivalente a la administración de una cantidad mayor de una formulación de polipéptido más heterogénea.

000082

Por lo tanto, existe necesidad de una formulación cristalina de polipéptidos terapéuticos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención suministra formas cristalinas de los polipéptidos TNFR2, que incluyen los polipéptidos TNFR2:Fc y el etanercept cristalino. Una modalidad de la invención es un cristal de etanercept; en ciertas modalidades el cristal de etanercept está en la forma de una barra, y/o tiene una longitud máxima de entre 0.5 milímetros y 1.5 milímetros de entre 0.05 milímetros y 0.3 milímetros.

La invención también suministra métodos para elaborar cristales de polipéptidos de TNFR2 tal como un polipéptido de fusión TNFR2-Ig o etanercept. En ciertas modalidades, los polipéptidos TNFR2 de monómeros; en modalidades adicionales los polipéptidos TNFR2 de multímeros tales como dímeros, trímeros u oligómeros. En modalidades adicionales, el polipéptido TNFR2 comparte al menos el 90% de la identidad de aminoácido a lo largo de la longitud de los aminoácidos 39 a 162 de ID de SEC. No.: 1.

La presente invención también se relaciona con el uso de los polipéptidos TNFR2 o los polipéptidos cristalinos TNFR2 descritos, tal como los polipéptidos cristalinos TNFR2:Fc o el etanercept cristalino, en la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento terapéutico de cada desorden médico descrito aquí.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

LA Figura 1 es una fotografía de cristales de etanercept formados de una solución de polipéptidos que contiene 50.96 mg de etanercept por mililitro, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 1 de adelante. El amortiguador de reservorio de cristalización fue HEPES 0.1M pH 7.0, PEG 6000 30%, cloruro de litio de 0.7M; después de 7 días a temperatura ambiente los cristales fueron cosechados manualmente, lavados profusamente en el amortiguador de reservorio anterior, y se tomó la fotografía. Los cristales de este grupo se sometieron a análisis de secuencia de aminoácido N-terminal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención está dirigida a polipéptidos TNFR2 en forma cristalina, y a métodos para elaborar y utilizar tales

.. 000084

polipéptidos cristalinos TNFR2. Los cristales del polipéptido son ventajosos por que los polipéptidos cristalinos pueden ser almacenados durante más largos periodos y pueden exhibir mayor estabilidad física y retención de la actividad biológica, bajo un rango más amplio de almacenamiento y condiciones de manejo que los polipéptidos que no se encuentran en forma cristalina.

Definiciones

"Polipéptido" se define aquí como proteínas o péptidos sintéticos y recombinantes que tienen generalmente más de 10 aminoácidos. "Ligador de polipéptido" puede ser un polipéptido formado mediante una serie de aminoácidos tan cortos como un aminoácido de longitud.

"Aislado", como se utiliza aquí, se refiere a un polipéptido o a otra molécula que se ha removido de su ambiente en el que ocurre de forma natural.

"Sustancialmente purificado", como se utiliza aquí, se refiere a un polipéptido que está sustancialmente libre de otros polipéptidos presentes en el ambiente en el cual este se presenta de manera natural o en el que este fue producido; una preparación de un polipéptido que ha sido sustancialmente

purificado contiene al menos 90% en peso (o la meno 95%, al menos 98%, o al menos 99% en peso) de ese polipéptido, en donde el peso del polipéptido incluye cualquier carbohidrato, lípido, u otros residuos covalentemente unidos al polipéptido. Una preparación de polipéptido sustancialmente purificada puede contener variación entre las moléculas de polipéptido dentro de la preparación, con respecto a la proporción y tipo de glicosilación u otra modificación postraducción, o con respecto a la conformación o proporción de la multimerización.

"Polipéptido purificado" como se utiliza aquí, se refiere a una preparación de polipéptido esencialmente homogénea; sin embargo, una preparación de polipéptido esencialmente homogénea puede contener la variación entre las moléculas de polipéptido dentro de la preparación, con respecto a la proporción y tipo de glicosilación otra modificación postraducción con respecto a la conformación o proporción de la multimerización.

Los polipéptidos de "longitud completa" son aquellos que tienen una secuencia de aminoácido primario completa del polipéptido como se tradujo inicialmente; por ejemplo, la forma de longitud completa de TNFR2 humano se muestra en la ID de SEC. No.:1. La "forma madura" de un polipéptido se

. 000086

refiere a un polipéptido que ha sufrido las etapas de procesamiento postraducción tal como clivaje de la secuencia de señal o el clivaje proteolítico para remover un prodominio. Las formas maduras múltiples de un polipéptido de longitud completa se pueden producir, por ejemplo, mediante clivaje de la secuencia de señal a sitios múltiples, o mediante la regulación diferencial de proteasas que clivan el polipéptido. Las formas maduras de tal polipéptido se pueden obtener mediante la expresión, en una célula de mamífero adecuada o en otra célula huésped, de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de longitud completa. La secuencia de la forma madura del polipéptido también se puede determinar en la secuencia de aminoácido de la forma de longitud completa, a través de la identificación de las secuencias de señal o los sitios de clivaje de proteasa. En ciertas modalidades, la forma madura del polipéptido TNFR2 de humano tiene un residuo de aminoácido N-Terminal seleccionado del grupo que consiste de los aminoácidos 23, 27, y 28 de la ID de SEC. No.:1, o un aminoácido N-Terminal seleccionado del grupo que consiste de cada aminoácido entre el aminoácido 1 y el aminoácido 39 de la ID de SEC. No.:1.

La "identidad porcentual" de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante la inspección visual y el cálculo matemático, y también se puede hacer la comparación al

.. 000087

comparar la información de la secuencia utilizando un programa de computadora. La primera etapa para determinar la identidad porcentual es alinear las secuencias de aminoácido con el fin de maximizar el traslape y las identidades, aunque minimizando los espacios del alineamiento. La segunda etapa para determinar la identidad porcentual es el cálculo de número de identidades entre las secuencias alineadas, divididas por el número total de aminoácidos en el alineamiento. Cuando se determina la identidad porcentual que una secuencia de aminoácido tiene "a lo largo de la longitud de" una secuencia de aminoácido objetivo, o una secuencia de aminoácido objetivo, la longitud de la secuencia de aminoácido objetivo es el valor mínimo para el número de bases total en el alineamiento. Por ejemplo, cuando se determina la identidad porcentual de una primera secuencia de aminoácido de 50 aminoácidos "a lo largo de la longitud de" una segunda secuencia de aminoácido de los aminoácidos 1 hasta 100 de la ID de SEC. No.:X, si la primera secuencia de aminoácido es idéntica a los aminoácidos 1 hasta 50 de la ID de SEC. No.:X, la identidad porcentual sería del 50%. Las identidades de los 50 aminoácidos divididos por la longitud total del alineamiento (100 aminoácidos). Un programa de computadora de ejemplo para alinear la secuencia de aminoácido y computar la identidad porcentual es el programa BLASTP disponible para uso por vía del sitio web de la

Biblioteca Nacional de Medicina
ncbi.nlm.nih.gov/Gora/wblast2.cgi, o el algoritmo UW-BLAST
2.0. Las configuraciones del parámetro estándar por defecto
para el UW-BLAST 2.0 se describen en el siguiente sitio de
Internet: sapiens.wustl.edu/blast/README.html. Además, el
algoritmo BLAST utiliza una matriz de calificación de
aminoácido BLOSUM62, y los parámetros opcionales que se
pueden utilizar son como sigue: (A) inclusión de un filtro
para enmascarar segmentos de la secuencia de consulta que
tenga baja complejidad composicional (determinada mediante el
programa SEG de Wootton y Federhen (Computers and Chemistry,
1993); y ver también Wootton y federhen, 1996, Analysis of
compositionally biased regions in SECuence databases, *Methods
Enzymol.* 266: 554-71) o los elementos que consisten de
repeticiones internas de periodicidad corta (determinada
mediante el programa XNU de Claverie y States (Computers and
Chemistry, 1993)), y (B) un umbral de significancia
estadística para reportar coincidencias contra las secuencias
de la base de datos, o una calificación E-score (la
probabilidad esperada de coincidencias encontradas
simplemente por azar, de acuerdo con el modelo estocástico
de Karlin y Altschul (1990); si la significancia estadística
adscrita a una paridad es mayor que el umbral de calificación
E-score, la paridad no será reportada); los valores de umbral
de calificación E-score son 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.01,

000000 89

0.001, 0.0001, $1e-5$, $1e-10$, $1e-15$, $1e-20$, $1e-25$, $1e-30$, $1e-40$, $1e-50$, $1e-75$, o $1e-100$. Otros programas utilizados por aquellos expertos en la técnica de la comparación de secuencia también pueden ser utilizados para alinear la secuencias de aminoácido, tal como, el Genetics Computer Group (GCG; Madison, WI) programa 10.0 versión de paquete Wisconsin "GAP" (Devereux et al., 1984, *Nucl. Acids Res.* 12: 387). Los parámetros por defecto del programa "GAP" incluyen: (1) La implementación del GCG de una matriz de comparación unario (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) para los nucleótidos, y la matriz de comparación de aminoácido pesada de Gribskov y Burgess, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, como se describió por Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Polypeptide SEquence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; u otros matices de comparación comparables; (2) una pena de 30 para cada espacio y una pena adicional de 1 para cada símbolo en cada espacio para la secuencias de aminoácido, o una pena de 50 para espacio y una pena adicional de 3 para cada símbolo en cada espacio para la secuencias de nucleótido; (3) ninguna pena para espacios finales; y (4) ninguna pena máxima para espacios largo.

"Formas solubles" de los polipéptidos TNFR2 de la invención comprenden ciertos fragmentos o dominios de estos

000097

polipéptidos. Los polipéptidos solubles son polipéptidos que son capaces de ser secretados de las células en los cuales ellos se expresan. El polipéptido soluble secretado se puede identificar (y distinguir de sus contrapartes unidas a membrana no solubles) al separar las células intactas que expresan el polipéptido deseado del medio de cultivo, por ejemplo, mediante centrifugación, y ensayar el medio (supernadante) para la presencia del polipéptido deseado. La presencia del polipéptido deseado en el medio indica que el polipéptido fue secretado de las células y así es una forma soluble del polipéptido. El uso de las formas solubles de polipéptido de citosina de la invención es ventajoso para muchas aplicaciones. Se facilita la purificación de los polipéptidos de células huéspedes recombinantes, en razón a que los polipéptidos solubles se secretan de las células. Más aún, los polipéptidos solubles son generalmente más adecuados en las formas unidas a membrana para la administración parenteral y para muchos procedimientos enzimáticos. En ciertas modalidades de la invención, las formas solubles maduras de los polipéptidos TNFR2 no contienen una transmembrana o un dominio de anclaje de membrana tal como los aminoácidos 258 hasta 87 de la ID de SEC. No.: 1, o contiene una porción insuficiente de tal dominio (por ejemplo 10 aminoácidos o menos) lo que resulta en la retención del polipéptido en una forma unida a membrana.

.. 000091

"Un polipéptido aislado que consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos" significa que el polipéptido puede opcionalmente tener, además de dicha secuencia de aminoácido material adicional covalentemente ligado a cualquiera o ambos extremos del polipéptido, dicho material adicional entre 1 y 10.000 aminoácidos adicionales covalentemente ligados a cualquiera o ambos extremos del polipéptido; o entre 1 y 1.000 aminoácidos adicionales covalentemente ligados a cualquiera o ambos extremos del polipéptido; o entre 1 y 100 aminoácidos adicionales covalentemente ligados a cualquiera o ambos extremos del polipéptido. El enlace covalente de los aminoácidos adicionales a cualquiera o ambos extremos del polipéptido de acuerdo con la invención da como resultado una secuencia de aminoácido combinada que no es de ocurrencia natural.

Polipéptidos TNFR2 para cristalización

Los polipéptidos TNFR2 son polipéptidos que comprenden al menos una porción de un polipéptido TNFR2 (receptor 2 del factor de necrosis de tumor), o al menos una porción de una variante de este. El polipéptido TNFR2 incluye los polipéptidos de fusión TNFR2-Ig descritos adelante, así como también los polipéptidos TNFR2:Fc, etanercept, y variantes,

.. 000092

formas monoméricas y multiméricas, versiones modificadas y conjugados de estos.

El polipéptido TNFR2 también ha sido llamado TNFRSF1B (miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis de tumor 1B), p75, y CD120b; la secuencia de aminoácido de longitud completa del polipéptido TNFR2 se muestra en la ID de SEC. No.: 1 (ver también el número de acceso de la base de datos Swiss-Prot P20333). Otro receptor de factor de necrosis de tumor relacionado pero distinto es el TNFR1, también denominado TNFRSF1A y p55 (ver también el Número de Acceso de la Base de Datos Swiss-Prot P19438). El TNFR2 y TNFR1 son conocidos por unirse al factor alpha de necrosis de tumor de citosina pleiotrópica (TNF-alpha o simplemente "TNF"), que está asociado con la inflamación. Además de unirse al TNF-alpha, los polipéptidos TNFR2 y TNFR1 median la unión a las células de homotrimeros del TNF-beta (más comúnmente denominado "limfotoxina-alpha", o LT-alpha), que es otra citosina asociada con la inflamación y que comparte similitudes estructurales con el TNF-alpha (por ejemplo, ver Cosman, *Blood Cell Biochem* 7:51-77, 1996). Como se utiliza aquí, "TNFR" o polipéptido "TNFR" se refiere a un polipéptido que es capaz de unirse al TNF-alpha o LT-alpha; ejemplos específicos de los polipéptidos TNFR son el TNFR2 y TNFR1. Como se utiliza aquí, "unión", o "unión de ligando", o

"tener actividad de unión de ligandos" significa unir un ligando tal como el TNF-alpha o LT-alpha con una afinidad (esto es, con una constante de inhibición de K_i) de al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ cuando se encuentre en una forma monomérica, o en una modalidad adicional, con una afinidad de al menos $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ cuando se encuentra en una forma de un multímero tal como un dímero o trímero, o con una afinidad de al menos $8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ cuando se encuentra en la forma de un multímero tal como un dímero o trímero. La afinidad de unión TNF-alpha (constante de inhibición) de un polipéptido TNFR2 o una variante de esta se puede determinar utilizando un ensayo de unión tal como aquel descrito en el Ejemplo 6 de adelante (ver también Mohler et al., 1993, *J Immunol* 151: 1548- 1561 and Peppel et al., 1991, *J Exp Med* 174 : 1483-1489). Similarmente, se pueden utilizar ensayos análogos para determinar la afinidad de unión del polipéptido TNFR2 o una variante de esta para el LT-alpha o cualquier otro ligando potencial. En "relacionado con TNFR", como se utiliza aquí, se refiere a polipéptidos que están relacionados por medio de similitud de secuencia de aminoácido o similitud estructural tridimensional con polipéptidos TNFR, pero que no necesariamente se unen a TNF-alpha o LT-alpha. Ejemplos de polipéptidos relacionados TNFR son los polipéptidos CD40 (Swiss-Prot Database Accession Number P25942) y OX40 (Swiss-Prot Database Accession Number P43489).

000094

Se han determinado las estructuras tridimensionales para el TNFR1 y para algunos polipéptidos relacionados con TNFR; por ejemplo, el dominio extracelular de p55 TNFR1 ha sido cristalizado y sometido al Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org/pdb/) bajo el número de acceso 1EXT, y el polipéptido p55 TNFR1 en asocio con su LT-alpha ligando ha sido sometido a PDB como 1TNR. También, en la fuente de Clasificación Estructural de Proteína (SCOP, scop.berkeley.edu) los polipéptidos TNFR y relacionados TNFR que definen el pliegue de proteína similar a receptor SCOP TNF están relacionados estructuralmente en que ellos comparten un dominio extracelular que tiene al menos tres dominios similares ricos en disulfuro. Por ejemplo, el TNFR2 como se muestra ID de SEC. No.:1, tiene cuatro de tales dominios, con la mayoría de los tres dominios N-terminales que comparten un patrón característico de residuos de cisteína conservada que están involucrados en la formación de unión de disulfuro. Los cuatro dominios ricos en disulfuro están en los aminoácidos 39 a 76, en los aminoácidos 77 a 118, en los aminoácidos 119 a 162, y en los aminoácidos 163 a 201 de la SEC. No.:1. Las uniones de disulfuro se forman entre los pares de residuo de cisteína en las siguientes suposiciones de aminoácidos: 40 y 53, 54 y 67, 57 y 75, 78 y 93, 96 y 110, 100 y 118, 120 y 126, 134 y 143, 137 y 161, y (en el cuarto dominio) 164 y 179; el

cuarto dominio de unión de disulfuro también contiene otro par de residuos de cisteína en los aminoácidos 184 y 200 de la ID de SEC. No.:1.

Los polipéptidos TNFR2 y las variantes de estos se pueden analizar por similitud tridimensional con polipéptidos TNFR estructuralmente caracterizados y con polipéptidos relacionados con TNFR al utilizar programas de computadora tales como el GeneFold (Tripos, Inc. , St. Louis, MO; Jaroszewski et al., 1998, *Prot Sci* 7: 1431-1440), un programa hilado de proteína que sobrepone una secuencia de proteína de consulta sobre derivados estructurales dentro del Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2000, *Nucleic Acids Res* 28 : 235-242). Para utilizar el GeneFold para evaluar la estructura de un polipéptido TNFR2 o una variante de este, la secuencia de polipéptido se ingresa en el programa, que le asigna una calificación de probabilidad que se refleja en que también esta se dobla sobre estructuras de proteína conocidas (estructuras "moldes") que están presentes en la base de datos GeneFold. Para la calificación, el GeneFold confía en la similitud de la secuencia de aminoácido primaria, patrones de residuos "burial", interacciones locales, y comparaciones de estructura secundaria. El programa GeneFold pliega (o hila) la secuencia de aminoácido sobre todas las estructuras molde en la base de datos de pliegue de proteína, que incluye

las estructuras resueltas para varios polipéptidos TNFR de humano tal como el p55 TNFR1 (el molde "ltnrR") y también el polipéptido relacionado con TNFR CD40 (el molde "lcdf_"). Para cada comparación, se calculan tres diferentes calificaciones, con base en (i) solamente la secuencia; (ii) la secuencia más las preferencias de conformación local más los términos "burial"; y (iii) la secuencia más las preferencias de conformación local más los términos "burial" más la estructura secundaria. En cada caso, el programa determina el alineamiento óptimo, calcula la probabilidad (valor P) de que este grado de alineamiento ocurra por casualidad, y reporta el inverso del valor P como la calificación. Estas calificaciones por lo tanto reflejan el grado al cual la secuencia de polipéptido de consulta coincide con las varias estructuras de referencia tales como la estructuras de polipéptidos TNFR. Cuando se utiliza el GeneFold para comparar un polipéptido TNFR2 o una variante de este (el polipéptido de consulta) u otros polipéptidos TNFR o relacionados con TNFR, el polipéptido de consulta coincidirá con el lcdf_, el ltnrR, y otro molde TNFR o relacionado con TNFR como el más alto golpe en una de las tres categorías de calificación, y/o coincidirá con un molde TNFR con cualquier calificación de al menos 500, o al menos 700, o al menos 900, o al menos 990, o 999.9 (la calificación máxima). Otro método para el análisis de un polipéptido TNFR2 o una variante de

.. 000097

este es el alineamiento de la estructura de aquel polipéptido de consulta con aquellos de las proteínas TNFR o relacionadas con TNFR a través del proceso bien conocido de modelamiento de homología. Un programa de software útil que se puede utilizar para el modelamiento de homología en el programa "Modeler" disponible Accelrys, una subsidiaria de Pharmacoepia Inc. (Princeton, NJ).

El polipéptido TNFR2 para cristalización comprende al menos una porción de la región extracelular del polipéptido TNFR2 de la ID de SEC. No.:1, o una variante de este. En ciertas modalidades, la región extracelular completa del polipéptido TNFR2 está incluida en el TNFR2. Como ciertos ejemplos, el polipéptido TNRF2 puede comprender los aminoácidos 28 hasta 257, o los aminoácidos 27 hasta 257, o los aminoácidos 23 hasta 257 de la ID de SEC. No.:1. En modalidades adicionales, la región extracelular del polipéptido TNFR2 está truncada para suprimir al menos un sitio de glicosilación ligado a N potencial (por ejemplo los aminoácidos 171 y 193 de la ID de SEC. No.:1) y/o una región rica en prolínea (por ejemplo los aminoácidos 24 hasta 36 de la ID de SEC. No.:1 o los aminoácidos 217 hasta 261 de la ID de SEC. No.:1) aunque dejando intacto los tres dominios más N-terminales que tienen puentes de sulfuro intramolecular. Por ejemplo, en una modalidad, el polipéptido TNFR2 comprende los aminoácidos 39

000098

a 162 de la ID de SEC. No.: 1, o los aminoácidos 39 a 179 de la ID de SEC. No.:1, o los aminoácidos 39 a 200 de la ID de SEC. No.:1, o una variante de cualquiera de los anteriores.

Los polipéptidos TNFR2 para cristalizar de acuerdo con la presente invención incluyen polipéptidos con longitudes de secuencia de aminoácido que son al menos 20% (o al menos 25%, o al menos 30%, o al menos 35%, o al menos 40%, o al menos 50%) de la longitud del polipéptido TNFR2 de la ID de SEC. No.:1 y tienen al menos 60% de identidad de secuencia (o al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, al menos 99%, o al menos 99.5%) con aquel polipéptido TNFR2. También incluido en la presente invención están los polipéptido TNFR2 y los fragmentos de polipéptido que contienen un segmento que comprende al menos 80, o al menos 90, o al menos 100, o al menos 110, o al menos 120, o al menos 130 aminoácidos contiguos de la ID de SEC. No.:1, o una variante de estos. Tales polipéptidos y fragmentos de polipéptido pueden contener también un segmento que comparte al menos 70% de identidad de secuencia (o al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97.5%, al menos 99%, o al menos 99.5%) con el polipéptido TNFR2 de la ID de SEC. No.:1.

000099

Cuando se hacen tales variantes de los polipéptidos TNFR2 para ser cristalizados, se pueden utilizar varias consideraciones para guiar aquellos expertos en la técnica en la elaboración de variantes que retengan la actividad biológica tal como la actividad de unión de TNF- α . En ciertas modalidades, será deseable retener al menos las regiones de unión de sulfuro N-terminales, o al menos todas las cuatro regiones de unión disulfuro descritas anteriormente para el polipéptido TNFR2 de la ID de SEC. No.:1. Adicionalmente, las porciones del dominio extracelular TNFR2 que comprende las tres regiones disulfuro N-terminales se pueden extender para incluir toda a una porción de la cuarta región de unión de disulfuro, y en particular modalidades en la que no están incluidas ninguna de las cisteínas de la cuarta región de unión disulfuro que incluya el primer par de cisterna (en los aminoácidos 164 y 179 de la ID de SEC. No.:1) que está incluido, y/o una región de la cuarta región de unión disulfuro que incluye el segundo par de cisteína (en los aminoácidos 185 y 200 de la ID de SEC. No.:1) que está incluido. Por lo tanto, las variantes comprendidas dentro del alcance de la invención retienen los residuos cisterna involucrados en la formación de las uniones disulfuro de estos dominios, y también retienen el espaciamiento aproximado (es decir el número de residuos de la secuencia de aminoácido primario) entre aquellas

000109

cisteínas. Por ejemplo, las variantes que no insertan o suprimen más de cinco aminoácidos entre los pares de cisteínas que forman las uniones disulfuro están dentro del alcance de la invención, como lo son las variantes que no insertan o suprimen más de cuatro aminoácidos entre tales cisteínas, y las variantes que no insertan o suprimen más de tres aminoácidos entre tales cisteínas, y las variantes que no insertan o suprimen más de dos aminoácidos entre tales cisteínas, y las variantes que no insertan o suprimen más de un aminoácido entre tales cisteínas.

Otras consideraciones que guiarán aquellos expertos en la técnica para elaborar variantes de polipéptidos TNFR2 es la naturaleza de las sustituciones de aminoácido que son hechas; tales sustituciones pueden ser conservadoras, que significan que el aminoácido presente en la variante en cierta posición tiene las mismas propiedades química y/o de tamaño que el aminoácido en la posición correspondiente en el polipéptido TNFR2 no alterado. La tabla 2 resume los grupos de aminoácidos que son considerados por tener propiedades similares, de tal forma que la sustitución de cualquier aminoácido con otro de la misma hilera de la Tabla 2 sería una sustitución conservadora. En ciertas modalidades, las variantes del polipéptido TNFR2 tienen 20% menos sustituciones de aminoácido (o 15% o menos, o 10% o menos, o

.. 000101

7.5% o menos, o 5% o menos, o 2.5% o menos, o 1% o menos) a lo largo de la longitud de los aminoácido 39 a 162 de la ID de SEC. No.:1, o de los aminoácidos 39 a 179 de la ID de SEC. No.:1, o de los aminoácidos 39 a 200 de la ID de SEC. No.:1. En ciertas modalidades, las variantes del polipéptido TNFR2 tiene 20% o menos sustituciones de aminoácidos conservadoras (o 15% o menos, o 10% o menos, o 7.5% o menos, o 5% o menos, o 2.5% o menos, o 1% o menos) a lo largo de la longitud de los aminoácidos 39 a 162 de la ID de SEC. No.:1, o de los aminoácidos 39 a 179 de la ID de SEC. No.:1, o de los aminoácidos 39 a 200 de la ID de SEC. No.:1.

En ciertas modalidades, los polipéptidos TNFR2 o las variantes de estos para ser cristalizados tienen una actividad de unión de TNF-alpha y/o actividad de unión LT-alpha.

Tabla 2

Sustituciones Conservadoras de Aminoácido

Básico	arginina; lisina; histidina
Ácido	Ácido glutámico; ácido aspártico
Polar	glutamina; asparagina
Hidrófobo	leucina; isoleucina; valina

.. 000102

Aromático	fenilalanina; triptofano; tirosina
Pequeño	glicina; alanina; serina; treonine; metionina

Proteínas de Fusión TNFR2

En ciertas modalidades, los polipéptidos TNFR2 se utilizan en los métodos de cristalización de la invención que incluyen polipéptidos TNFR2 fusionados con una porción de un polipéptido Ig (immunoglobulina), o una variante de ésta opcionalmente con un ligador polipéptido entre la porción TNFR2 y la porción Ig del polipéptido de fusión TNFR2-Ig. (El ligador polipéptido opcional puede ser tan corto un aminoácido de longitud, cuando este está presente en un polipéptido de fusión TNFR2). Los polipéptidos de inmunoglobulina (Ig) están relacionados mediante secuencia de aminoácido y también mediante la estructura tridimensional. La superfamilia Ig de polipéptidos, como se definió SCOP, es un subconjunto de proteínas que tienen el pliegue "sándwich beta similar a inmunoglobulina", que se describe por tener generalmente siete hebras dispuestas en dos láminas, aunque algunos miembros de pliegues dobles tengan hebras adicionales. La superfamilia Ig está subdividida en cuatro familias de dominio de proteínas: los dominios del conjunto V (similar a dominio de variable de anticuerpo); los dominios del conjunto C1 (similares a dominios de constante de

.. 000103

anticuerpos); los dominios de conjunto C2; y los dominios de conjunto I.

El polipéptido de fusión TNFR2-Ig comprende al menos una porción de un polipéptido Ig, por ejemplo, al menos 10 aminoácidos contiguos de una región constante de un polipéptido Ig o un polipéptido de al menos 14 aminoácidos de longitud que comparte al menos 70% de identidad de aminoácido con al menos 20 de aminoácidos contiguos de una región constante de un polipéptido Ig. Un polipéptido de fusión TNFR2-Ig de la presente invención puede preferiblemente comprender al menos una región constante de cadena pesada y, en ciertas modalidades, al menos una región constante de cadena ligera.

En ciertas modalidades, el polipéptido Ig comprende una región constante de una cadena pesada de clase IgG o un fragmento y/o variante de esta, y en otras modalidades la región constante de otros isotipos de inmunoglobulina se pueden utilizar para generar tales fusiones TNFR2-Ig. Por ejemplo un polipéptido de fusión TNFR2-Ig que comprende la región constante de una cadena pesada de clase IgM o un fragmento y/o variante de este se puede utilizar para generar una forma de covalente del polipéptido de fusión TNFR2-Ig. La región constante de las cadenas pesadas de inmunoglobulina,

con un ejemplo específico de un dominio constante de cadena pesada de clase IgG1 humano mediante la ID de SEC. No.:2, comprende un dominio CH1 (aminoácidos 1 a 98 de la ID de SEC. No.:2), una región de articulación (aminoácidos 99 a 110 de la ID de SEC. No.:2), un dominio CH2 (aminoácidos 111 a 223 de la ID de SEC. No.:2), y un dominio CH3 (aminoácidos 224 a 330 de la ID de SEC. No.:2). La ID de SEC. No.:3 suministra un ejemplo específico de una variante de un dominio constante de cadena pesada clase IgG1, en la cual se han hecho dos sustituciones de aminoácido (El Glu se ha sustituido por Asp en la posición 239, y el Met se ha sustituido por Leu en la posición 241). Ciertas modalidades de la invención incluyen los polipéptidos de fusión TNFR2-Ig que comprenden toda a una porción del dominio extracelular de polipéptido TNFR2 (ID de SEC NO: 1) fusionado a toda o a una porción de la ID de SEC. No.:2 o ID de SEC. No.:3, opcionalmente con un polipéptido ligador entre la porción TNFR2 y la porción Ig del polipéptido de fusión TNFR2-Ig. En modalidades adicionales de la invención, una región constante de cadena pesada que comprende al menos una porción de CH1 es la porción Ig del polipéptido de fusión TNFR2-Ig. Ciertas modalidades también pueden incluir, por ejemplo, la mitad C-terminal de región de articulación para suministrar un puente de disulfuro entre cadenas pesadas. En ciertas modalidades de esta invención, el polipéptido TNFR2 está covalentemente ligado, opcionalmente a

000105

través de un ligador polipéptido, al terminal N de al menos una porción la región CH₁ del dominio constante de cadena pesada para formar un polipéptido de fusión TNFR2-Ig.

En ciertas modalidades adicionales, al menos una porción de la región de articulación está unido a la región CH₁. Como un ejemplo, CH₁ y CH₂ están presentes en la molécula, y la región de articulación completa también está presente. Como otro ejemplo CH₁ está presente junto con los primeros siete aminoácidos de la articulación (aminoácidos 99 a 105 de la ID de SEC. No.:2 o 3). Se entenderá por un experto en la técnica que los polipéptidos de fusión TNFR2-Ig de la invención pueden ser, por ejemplo, monoméricos o diméricos, y que si se desea el polipéptido de fusión TNFR2-Ig dimérico, es importante incluir la porción de articulación de la región implicada en la formación de unión disulfuro entre las cadenas pesadas (por ejemplo, una porción de los aminoácidos 99 hasta 110 de la ID de SEC. No.:2 o 3 que incluye los aminoácidos 109 de la ID de SEC. No.:2 o 3). En modalidades adicionales de la invención, el polipéptido de fusión TNFR2-Ig puede comprender porciones del dominio CH₃ que no incluye el residuo licina C-terminal (aminoácido 330 de la ID de SEC. No.:2 o 3), como o en razón a que este residuo ha sido observado para ser removido en procesamiento de postraducción de los polipéptidos de cadena pesada Ig.

Dominios Fc

Como se utiliza aquí un dominio Fc puede contener uno o todos los dominios CH1, articulación, CH2 y CH3 de cadena pesada descritos anteriormente, o fragmentos o variantes de estos, y pueden ser monoméricos, diméricos, o multiméricos determinados mediante los constituyentes del polipéptido de fusión TNFR2-Ig que comprende el dominio Fc.

Ciertos polipéptidos específicamente contemplados por la cristalización de acuerdo con la invención incluyen los polipéptidos de fusión TNFR2-Ig que comprenden al menos una porción de un dominio Fc. Un polipéptido tiene TNFR2 preferido adecuado para tratar enfermedades en humanos y otros mamíferos es TNFR2:Fc, que se utiliza aquí para referirse a todo o a una porción de un dominio extracelular de un polipéptido TNFR2 o una variante de este, fusionada con la porción Fc de un polipéptido de inmunoglobulina, opcionalmente con un ligador polipéptido entre la porción TNFR2 y la porción Fc del polipéptido TNFR2:Fc.

Otros dominios multimerizantes

Los multímeros de la invención incluyen los polipéptidos TNFR2 para cristalización, en donde los polipéptidos TNFR2 están en formas dimérica, trimérica, decamérica, u otra forma multimérica. Otro método para preparar los multímeros de la invención involucra el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de la cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de los polipéptidos en los cuales ellos se encuentran. Las cremalleras de leucina fueron originalmente identificadas en varios polipéptidos de unión de ADN (Landschulz et al., *Science* 240: 1759, 1988), y han sido encontrados en una variedad de polipéptidos diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas están los péptidos de ocurrencia natural y los derivados de estos que se dimerizan o trimerizan. El dominio entre las cremalleras de leucina conocidas están los péptidos de ocurrencia natural y los derivados de estos que se dimerizan o trimerizan. El dominio de cremallera (también denominado aquí como un dominio de formación multimerizante o multímero) comprende una repetición heptad repetitiva, a menudo con cuatro o cinco residuos de leucina entremezclados con otros aminoácidos distribuidos a intervalos. El uso de cremalleras de leucina y preparaciones de multímeros que utilizan cremalleras de leucinas son bien conocidas en la técnica. Otros dominios de multimerización incluyen el dominio de trimerización encontrado en la proteína tensoactiva del pulmón (Kovacs et

000108

al., 2002, *J Biomol NMR* 24: 89-102) y otros de tales dominios conocidos en la técnica.

Etanercept

En una modalidad, el polipéptido TNFR2 que se cristaliza es el "etanercept", que es un dímero de dos polipéptidos que consisten cada una de 235 aminoácidos derivados de la porción extracelular del polipéptido TNFR2, fusionado a una porción de 232 aminoácidos de IgG1 humano. La secuencia de aminoácido del componente monomérico de etanercept se muestra como ID de SEC. No.:4. El forma dimérica de esta molécula, dos de estos polipéptidos de fusión (o "monómeros") se mantienen juntos mediante tres uniones de disulfuro que se forman entre las porciones de inmonoglobulina de los dos monómeros. El dímero de etanercept consiste por lo tanto de 934 aminoácidos, y tienen un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodaltons (Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc., pp. 1752-1755). El Etanercept es habitualmente vendido bajo el nombre comercial ENBREL® (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA).

Glicosilación y Conjugados

000109

La invención incluye los polipéptidos TNFR2 de la invención con y sin glicosilación de patrón nativo asociada. Los polipéptidos expresados en los sistemas de expresión de levadura o mamífero (por ejemplo, células COS-1 o CHO) pueden ser similares a o significativamente diferentes de un polipéptido humano nativo en peso molecular y patrón de glicosilación, dependiendo de la escogencia de sistema de expresión. La expresión de los polipéptidos de la invención en sistemas de expresión bacterianos, tal como el E. coli, no suministran moléculas glicosiladas. Además, una preparación dada puede incluir diferencialmente múltiples especies glicosiladas del polipéptido. Los grupos glicosilados se pueden remover a través de métodos convencionales, en particular aquellos que utilizan glicopeptidasa. En general, los polipéptidos glicosilados de la invención pueden ser incubados con un exceso molar de glicopeptidasa (Boehringer Mannheim).

El polipéptido TNFR2 para cristalización y uso en las terapias descritas aquí se puede conjugar con polietilenglicol (pegilado) para prolongar su vida media de suero o para mejorar el suministro de proteína. Como ejemplo de un polipéptido TNFR pegilado derivado de TNFR p55 es el TNFR p55 soluble conjugado de polietilenglicol (PEG-sTNFR tipo I), que contiene el dominio extracelular TNFR p55; los

polipéptidos TNFR2 y los fragmentos de estos pueden ser conjugados con polietilenglicol en una forma similar. Los reactivos y métodos para pegilación de polipéptidos se describen, por ejemplo, en la WO 92/16221; WO 99/102330; y la Patente U. S. Nos. 6,420,339; 6,433,158; 6,441,136; 6,451,986; 6,548,644; y 6,552,170; todos los cuales se incorporan aquí como referencia.

La invención también comprende formas cristalinas de los polipéptidos TNFR2 conjugados con una sustancia citotóxica o luminiscente. Tales sustancias incluyen: derivados de maitansino (tales como DM1); enterotoxinas (tales como enterotoxinas Staphylococcal); otras proteínas y compuestos (tal como Ricina-A, toxina Pseudomonas, toxina Difteria, daunorubicina, doxorubicina, metotrexato, y Mitomicina C); isótopos de yodo (tal como yodo-125); isótopos de tecnecio (tal como Tc-99m); otros isótopos (^{212}Bi , ^{131}I , ^{186}Re , y ^{90}Y); fluorocromos cianina (tal como Cy5.5.18); y polipéptidos inactivantes de ribosoma (tal como bouganina, gelonina, o saporina-S6).

Producción y Purificación de Polipéptidos para Cristalización

El polipéptido TNFR2 se puede producir de células huéspedes vivas que expresan el polipéptido, tal como la células

000111

huéspedes que han sido genéticamente trabajadas con ingeniería para producir el polipéptido. Los métodos de las células genéticamente trabajadas con ingeniería para producir polipéptidos son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Ausubel et al., eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York). Tales métodos incluyen introducir ácido nucleico que codifica y permite la expresión del polipéptido en células huéspedes vivas. Estas células huéspedes pueden ser células bacterianas, células fungosas, células de insecto, o células animales que crecen en cultivo. Las células huésped bacterianas incluyen, pero no están limitadas a, células de *Escherichia coli*. Ejemplos de cepas de *E. coli* adecuadas incluyen: HB101, DHS α , GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, y cualquier cepa de *E.* que falle al clivar ADN extraño. Las células huéspedes fungosas que se pueden utilizar incluyen, pero no están limitadas a, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastors*, y células de *Aspergillus*. Unos pocos ejemplos de líneas celulares animales que se pueden utilizar son CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, y WI38. Nuevas líneas de células animales se pueden establecer utilizando métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica (por ejemplo, mediante la transformación, infección viral, y/o selección). Opcionalmente, el polipéptido puede ser secretado mediante células huéspedes en el medio.

La purificación del polipéptido TNFR2 expresado se puede desarrollar mediante cualquier método estándar. Cuando el polipéptido TNFR2 se produce intracelularmente, los desechos de partículas se remueven, por ejemplo, mediante su centrifugación o ultra filtración. Cuando el polipéptido es secretado en el medio, los supernadantes de tales sistemas de expresión pueden ser primero concentrados utilizando filtros de concentración de polipéptido estándar. Los inhibidores de proteasa también pueden se pueden agregar para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de microorganismos. Los polipéptidos TNFR2 se pueden producir en la presencia de proteínas chaperona o accesorias con el fin de obtener una conformación de polipéptido deseada, o se puede someter a condiciones tales como condiciones de oxidación y/o reducción después de la producción con el fin de inducir redoblado o cambios en la conformación de polipéptido (ver, por ejemplo, WO 02/068455).

El polipéptido TNFR2 se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electrofóresis de gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, y cualquier combinación de técnicas de purificación conocidas o aún por descubrir. Por ejemplo, la proteína A se puede utilizar para purificar los polipéptidos TNFR2-Ig que se basan en cadenas

000113

pesadas humanas gama 1, gama 2, o gama 4 (Lindmark et al., 1983, J. Immunol. Meth. 62: 1-13), donde la porción Ig del polipéptido de fusión TNFR2-Ig contiene la porción del dominio constante involucrado en la unión a la proteína A. La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para el gama 3 humano (Guss et al., 1986, EMBO J. 5: 1567-1575). Se pueden utilizar otras técnicas para la purificación del polipéptido TNFR2, dependiendo de la necesidad, incluyendo pero no estando limitado al fraccionamiento sobre una columna de intercambio de iones, la precipitación con etanol u otros alcoholes, el HPLC de FACE inversa, FPLC, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio de aniones o cationes (tal como una columna de ácido Piliaspártico), cromatografía de interacción hidrófoba, cromatoenfoque, SDS-PAGE, y precipitación de sulfato de amonio también se puede utilizar dependiendo de la necesidad.

Producción de Cristales, Formulaciones de Cristal, y Composiciones:

Los cristales de polipéptido crecen mediante cristalización controlada de polipéptidos provenientes de soluciones acuosas o de otras soluciones que contienen solventes orgánicos o aditivos. Las condiciones de solución se que pueden controlar

.. 000114

incluyen, por ejemplo, la proporción de evaporación del solvente, los solventes orgánicos o los aditivos, la presencia de co-solutos y amortiguadores adecuados, pH, y temperatura. Una revisión comprensiva de varios factores que afectan la cristalización de las proteínas se ha publicado por la McPherson, 1985, *Methods Enzymol* 114 : 112-120. Además, McPherson y Gilliland, 1988, *J Crystal Growth*, 90:51-59 han compilado listas comprensivas de polipéptidos que se han cristalizado, así como también las condiciones bajo las cuales ellos fueron cristalizados. Un compendio de cristales y de recetas de cristalización, así como también un depósito de coordenadas de estructura de proteína resuelta, se mantiene en el Protein Data Bank at the Brookhaven National Laboratory (www.rcsb.org/pdb/; Bernstein et al., 1977, *J Mol Biol* 112: 535-542). Estas referencias se pueden utilizar para determinar las condiciones necesarias para la cristalización de un polipéptido, como prelude a la formación de los cristales de polipéptido apropiados y puede guiar la estrategia de cristalización para otro polipéptido. Se debe notar, sin embargo, en que las condiciones reportadas en la mayoría de las referencias anteriormente citadas se han optimizado para producir, en la mayoría de los casos, uno pocos cristales grandes con calidad de difracción. De acuerdo con esto, se apreciará por aquellos expertos en la técnica que algún grado de ajuste de estas condiciones para

.. 000115

suministrar un proceso de alta producción para producción a gran escala de los cristales de polipéptido puede ser necesario.

En general, los cristales son producidos al combinar el polipéptido ha ser cristalizado con un solvente acuoso apropiado o un solvente acuoso que contiene agentes de cristalización apropiados, tal como sales o solventes o aditivitos orgánicos. El solvente se combina con el polipéptido y puede ser sometido a agitación a una temperatura determinada experimentalmente para ser apropiada para la inducción de cristalización y aceptable para el mantenimiento de la actividad y estabilidad del polipéptido. El solvente puede opcionalmente incluir co-solutos, tal como cationes divalentes, co-factores, o caotrópos, así como también especies amortiguadoras para controlar pH. "Medios de Co-soluto" para cristalización incluyen compuestos que pueden suministrar un co-soluto para facilitar la cristalización de un polipéptido. Ejemplos de medios de co-soluto incluyen acetato de amonio, cloruro de amonio, fluoruro de amonio, formato de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de cadmio, sulfato de cadmio, acetato de calcio, cloruro de cadmio, cloruro de cesio, cloruro de cobalto, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3+\text{Br}^-$ (CTAB), citrato de diamonio, hidrogenfosfato de diamonio, fosfato de diamonio,

000116

tartrato de diamonio, fosfato de dipotasio, fosfato de disodio, tartrato de disodio, ácido DL-málico, cloruro férrico, L-prolina, acetato de litio, cloruro de litio, nitrato de litio, sulfato de litio, acetato de magnesio, cloruro de magnesio, formato de magnesio, nitrato de magnesio, sulfato de magnesio cloruro de níquel, acetato de potasio, bromuro de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, fluoruro de potasio, formato de potasio, nitrato de potasio, fosfato de potasio, tartrato de potasio sólido, sulfato de potasio, tiocianato de potasio, acetato de potasio, bromuro de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, fluoruro de sodio, formato de sodio, malonato de sodio, nitrato de sodio, fosfato de sodio, sulfato de sodio, tiocianato de sodio, ácido succínico, tacsinato, citrato triamonio, citrato de trilitio, N-óxido de trimetilamina, citrato de tripotasio, citrato de trisodio, acetato de zinc, sulfato de zinc, y otros compuestos que funcionan para suministrar co-solutos. "medios amortiguantes de cristalización" incluyen compuestos que mantiene el pH de una solución en un rango deseado para facilitar la cristalización de un polipéptido. Ejemplos de medios de amortiguantes de cristalización incluyen ACES ácido (N-(2-acetamido)-2-aminoetanesulfónico), BES (ácido N,N-bis (2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), Bicina (N,N-Bis(2-hidroxietil) glicina), BIS-TRIS(2,2-bis-(hidroximetil)-2,2',2"-

.. 000117

nitritotriietanol), ácido bórico, (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propano-sulfónico) CAPS, (HEPPS, ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-propanosulfónico) EPPS, Gly-Gly (NH₂CH₂CONHCH₂COOH, glicyl-glicine), (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazino-1-etano-sulfónico) HEPES, imidazol, (ácido 2-morfolinoetanesulfónico) MES, (ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico) MOPS, (ácido piperazina-1,4-bis(2-etanesulfónico) PIPES), acetato de sodio, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio monobásico (higrogen fosfato de sodio), (ácido N-[tris-(hidroximetil)metil]-3-aminopropanesulfónico) TAPS, (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-3-amino-2-hidroxiopropanosulfónico) TAPSO, (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetano-sulfónico) TES, Tricina (N-[tris(hidroximetil)metil]glicina), Tris-HCl, TRIZMA (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol), y otros compuesto que funcionan para mantener una solución a un pH cercano al especificado.

La necesidad de co-solutos, amortiguadores, etc. y sus concentraciones se determinan experimentalmente para facilitar la cristalización. Algunos ejemplos de condiciones de cristalización adecuadas para un polipéptido se describen en los ejemplos 1, 2, y 3 adelante.

.. 000118

En un proceso a escala industrial, la precipitación controlada que conduce la cristalización se puede llevar a cabo mejor mediante la combinación simple de polipéptido, precipitante, co-solutos y, opcionalmente, amortiguadores en un proceso de tanda. Como otra opción, los polipéptidos se pueden cristalizar al utilizar precipitados de polipéptido como el material de partida ("semilla"). En este caso, los precipitados de polipéptidos se agregan a una solución de cristalización e incuban hasta que se forme el cristal. Los métodos de cristalización de laboratorios alternativos, tales como diálisis o difusión de vapor, también se pueden adoptar, McPherson, supra y Gilliland, supra, incluyen una lista comprensiva de condiciones adecuadas en sus revisiones de la literatura de cristalización. Ocasionalmente, en casos en los cuales el polipéptido cristalizado va a ser reticulado, incompatiblemente entre un agente de reticulación pretendido y el medio de cristalización podría requerir intercambiar los cristales en un sistema solvente más adecuado.

De acuerdo con una modalidad de esta invención, los cristales de polipéptido, las formulaciones de cristal y las composiciones se preparan mediante el siguiente proceso: primero, el polipéptido se cristaliza. Luego, los excipientes o los ingredientes como se describen aquí se agregan directamente al licor madre. Alternativamente, los cristales

.. 000119

se suspenden en una solución de excipiente u otros ingredientes de formulación, después de que se remueve el licor madre, durante un mínimo de 1 hora a un máximo de 24 horas. La concentración de excipientes está típicamente entre aproximadamente 0.01 a 30% P/P, que corresponde a una concentración de cristal de polipéptido de 99.99 a 70% P/P, respectivamente. En una modalidad, la concentración de excipiente está entre aproximadamente 0.1 a 10%, que corresponde a la concentración de cristal de 99.9 a 90% P/P, respectivamente. El licor madre se puede remover de la suspensión de cristal o mediante filtración o mediante centrifugación. Subsecuentemente, los cristales se lavan opcionalmente con soluciones de 50 a 100% uno o más solventes orgánicos o aditivos tales como, por ejemplo, etanol, metanol, isopropanol, o acetato de etilo, o a temperatura ambiente o a temperaturas entre 20°C a 25°C. Los cristales se secan al pasar la corriente de nitrógeno, aire, o gas inerte sobre los cristales. Alternativamente, los cristales se secan mediante secado con aire o mediante liofilización o mediante secado al vacío. El secado se lleva a cabo durante un mínimo de 1 hora a un máximo de 72 horas después del lavado, hasta que el contenido de humedad del producto finaliza por debajo del 10% en peso, más preferiblemente por debajo del 5%. Finalmente, la micronización de los cristales se puede desarrollar si es necesario. El secado de los cristales de

.. 000129

polipéptido es la remoción de agua, el solvente orgánico o aditivo, o el polímero líquido por medios que incluyen secado con N₂, aire, o gases inertes; secado con horno al vacío; liofilización; lavado con un solvente orgánico volátil o aditivo seguido mediante la evaporación del solvente; o evaporación en una caperuza de humo. Típicamente, el secado se logra cuando los cristales se vuelven un polvo de flujo libre. El secado puede ser llevado a cabo al pasar una corriente de gas sobre cristales húmedos. El gas se puede seleccionar del grupo que consiste de: nitrógeno, argón, helio, dióxido de carbono, aire o una combinación de estos. Los cristales de polipéptido de la invención se pueden procesar adicionalmente para lograr una distribución de tamaño de partícula deseada al micronizar en un molino adecuado, tal como un molino de chorro, y los componentes de la formulación en partícula o polvo se pueden mezclar antes o después de micronización. El diámetro de las partículas logrado puede estar en el rango de 0.1 a 100 micrómetros, o en el rango de 0.2 a 10 micrómetros, o en el rango de 10 a 50 micrómetros, o en el rango de 0.5 a 2 micrómetros. Para que las formulaciones sean administradas mediante inhalación en una modalidad las partículas formadas de los cristales de polipéptido están en el rango de 0.5 a 1 micrómetros.

.. 000121

De acuerdo con una modalidad de esta invención, cuando se preparan cristales de proteína, las formulaciones o las composiciones de cristal de proteína, mejoradores, tales como tensoactivos no se agregan durante la cristalización. Los excipientes o ingredientes se agregan al licor madre después de la cristalización, a una concentración de entre aproximadamente 1-10% P/P, alternativamente a una concentración 0.1-25% P/P, alternativamente a una concentración de entre aproximadamente 0.1-50% P/P. Estas concentraciones corresponden a concentraciones de cristal de 99-90% P/P, 99.9-75% P/P y 99.9-50% P/P, respectivamente. El excipiente o ingrediente se incuba con los cristales en el licor madre durante aproximadamente 0.1-3 horas, alternativamente la incubación se lleva a cabo durante 0.1-12 horas, alternativamente la incubación se lleva a cabo durante 0.1-24 horas.

En otra modalidad de esta invención, el ingrediente o excipiente se disuelve en una solución diferente del licor madre, y los cristales de proteína se remueven del licor madre y se suspenden en el excipiente o solución de ingredientes. Las concentraciones de ingrediente o excipiente y los tiempos de incubación son iguales que aquellos descritos anteriormente.

- 000122

Cristales de Polipéptido

Como se utiliza aquí, "cristal" o "cristalino" se refiere a una forma del estado sólido de la materia, que es distinta de una segunda forma - el estado sólido amorfo. Los cristales despliegan particularidades características que incluyen una estructura de red, formas características, y propiedades ópticas tales como índice de refracción y birrefringencia. Un cristal consiste de átomos dispuestos en un patrón que se repite periódicamente en tres dimensiones (C. S. Barrett, Structure of Metals, 2da ed., McGraw-Hill, New York, 1952, p.1). Como contraste, el material amorfo es una forma sólida no cristalina de materia, algunas veces denominada como un precipitado amorfo. Tales precipitados no tienen estructura molecular de red característica del estado sólido cristalino y no despliegan birrefringencia u otras características espectroscópicas típicas de las formas cristalinas de materia.

Los cristales de polipéptido son moléculas de polipéptidos dispuestas en una red de cristal. Los cristales de polipéptido contienen un patrón de interacción de polipéptidos-polipéptidos específicas que son repetidas periódicamente en tres dimensiones. Los cristales de polipéptidos de esta invención se deben distinguir de las

000123

formas sólidas amorfas o los precipitados de polipéptidos, tales como aquellos obtenidos mediante liofilización o al liofilizar una solución de polipéptido.

En los cristales de polipéptido, las moléculas del polipéptido forman unidades asimétricas que están dispuestas juntas para formar unidades simétricas. La estructura geométrica de las unidades simétricas de los cristales de polipéptidos pueden ser cúbicas, hexagonales, monoclinicas, ortorrómbicas, tetragonales, triclinicas, o trigonales. La estructura total de los cristales en su totalidad pueden estar en la forma de bipirámides, cubos, agujas, platas, prismas, romboides, barras o esferas, o combinaciones de estas. Los cristales que son de la clase estructural "cúbica" pueden tener más específicamente formas cristalinas octadecahédricas o dodecahédricas. El diámetro de los cristales se define como el diámetro de Martin. Este se mide como la longitud de la línea, paralela a la escala ocular, que divide los cristales aleatoriamente orientados en dos áreas proyectadas iguales. Los cristales en las formas tales como agujas o barras también tendrán una dimensión máxima que es denominada aquí como longitud del cristal.

Formulaciones para Administración Terapéutica

.. 000124

Como se utiliza aquí, una "composición" se entiende por significar una mezcla que comprende al menos dos componentes. En particular, la invención suministra composiciones que comprenden un polipéptido TNFR2 cristalino, o preparado utilizando un polipéptido TNFR2 cristalino. En una modalidad de la invención la composición o formulación que comprende o preparada utilizando un polipéptido TNFR2 cristalino se prepara de tal forma que este es adecuado para inyección y/o administración a un paciente necesitado de ello. Las composiciones al ser administradas con propósitos farmacéuticos a los pacientes son sustancialmente estériles y no contienen ningunos agentes que sean indebidamente tóxicos o infecciosos al receptor.

En una modalidad de la invención, los polipéptidos TNFR2 cristalinos tales como el etanercept se administran en la forma de una composición fisiológicamente aceptable (también denominada aquí como una composición farmacéutica o como una formulación farmacéutica) que comprende un polipéptido TNFR2 que se formula con uno o más de lo siguiente: portadores fisiológicamente aceptables, excipientes, o diluyentes. Tales portadores, excipientes, o diluyentes son no tóxicos a los receptores en dosis y concentraciones empleadas. Ordinariamente, la preparación de tales composiciones implican combinar el polipéptido TNFR2 cristalino con uno o

. 000125

más de lo siguiente: amortiguadores, antioxidante tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (tal como aquellos que tienen menos de 10 aminoácidos) proteínas, aminoácidos, carbohidratos tales como glucosa, sucrosa dextrinas, agentes quelantes tales como DTA, glutathione u otros estabilizadores y excipientes. En las formulaciones líquidas, la solución salina amortiguada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero con específico son ejemplos de diluyentes apropiados de acuerdo con los estándares apropiados de la industria, también se pueden agregar preservativos, tales como benzil alcohol. Ejemplos adicionales de componentes que se pueden emplear en formulaciones farmacéuticas son presentados en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980, y en la *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, publicado conjuntamente con la American Pharmaceutical Association y el Pharmaceutical Society de Gran Bretaña.

En una modalidad, se contempla que la formulación de la invención se prepara en formulación en masa y como tal, los componentes de la composición farmacéutica se ajustan de tal forma que ellos son mayores de lo que se requeriría para administración, y son diluidos apropiadamente antes de administración. Los cristales de polipéptido de la presente

invención se pueden formular como una formulación cristalina sólida o de polvo en formas adecuadas para almacenamiento y manejo, y en formas adecuadas para inhalación o administración pulmonar, por ejemplo en la forma de polvos para la precipitación de formulaciones de aerosol. En una modalidad adicional, los cristales de polipéptido se pueden formular en una solución líquida de tales cristales, o en una suspensión de tales cristales. En otra modalidad, los cristales de polipéptido son utilizados para preparar una formulación líquida, tal como una formulación acuosa, para administración terapéutica.

Formulaciones Cristalinas Sólidas

Las formulaciones sólidas de cristales son idealmente adecuadas para administración pulmonar, que es particularmente útil para macromoléculas biológicas que son difíciles de suministrar mediante otras rutas de administración. (ver, por ejemplo, solicitudes de patente PCT WO 96/32152, WO 95/24183 y WO 97/41833).

Las formulaciones sólidas de cristales de polipéptido incluyen cristales que han sido sustancialmente aislados de la solución líquida o secas y están presentes como cristales libres o como partículas en por ejemplo forma de polvo. En el

.. 000127

presente contexto la expresión "polvo" se refiere a una conexión de partículas esencialmente secas, es decir, el contenido de humedad está por debajo del 10% en peso, o por debajo del 6% en peso, o por debajo del 4% en peso. En una modalidad la invención suministra un método para aerosolizar una dosis de polipéptido TNFR2 cristalino que comprende suministrar el polipéptido TNFR2 cristalino como un polvo seco, dispersar una cantidad de polvo seco en una corriente de gas y formar un aerosol, y capturar el aerosol en una cámara para la subsecuente inhalación.

Los cristales o los polvos de polipéptidos pueden ser opcionalmente combinados con portadores y tensoactivos. Los agentes portadores adecuados incluyen 1) carbohidratos, por ejemplo monosacáridos tales como fructosa, galactosa, glucosa, sorbosa, y similares; 2) disacáridos, tales como lactosa, trehalosa y similares; 3) polisacáridos, tales como rafinosa, maltodextrinas, dextranos, y similares; 4) alditoles, tales como manitol, xilitol, y similares; 5) sales inorgánicas, tales como cloruro de sodio, y similares; y 6) sales orgánicas, tales como citrato de sodio, ascorbato de sodio, y similares. En ciertas modalidades, el portador seleccionado del grupo que consiste de trehalosa, rafinosa, manitol, sorbitol, xilitol, inositol, sucrosa, cloruro de sodio, y citrato de sodio. Los tensoactivos pueden ser

seleccionados de un grupo que consiste de sales de ácidos grasos, sales de bilis y fosfolípidos. Las sales de ácido grasos incluyen sales de ácidos grasos C₁₀₋₁₄, tal como, caprato de sodio, laurato de sodio, y miristato de sodio. Las sales de bilis incluyen sales de uso de oxicolato, taurocolato, glicocolato, y taurodihidrofusidato. En una modalidad, el tensoactivo es una sal de taurocolato tal como taurocolato de sodio. Los fosfolípidos que se pueden utilizar como tensoactivos incluyen lisofosfatidilcolina. La proporción molar del polipéptido cristalino a tensoactivo en una formulación de polvo de la presente invención es por ejemplo 9:1 a 1:9, o entre 5:1 a 1:5, o entre 3:1 a 1:3.

Cristales en Solución o Suspensión

En una modalidad, esta invención suministra un método para hacer los cristales de polipéptido adecuados para almacenamiento y suspensiones que comprenden reemplazar el amortiguador de cristalización (el licor madre) con un solvente no acuoso. En aún otra modalidad, la suspensión cristalina se puede producir sólida al hacer girar el primer solvente y lavar el sólido cristalino restante utilizando un segundo solvente orgánico o aditivo para remover el agua, seguido de la evaporación del solvente no acuoso. La

.. 000129

suspensión no acuosa de proteínas terapéuticas cristalinas se utiliza especialmente para suministro subcutáneo.

En una de tales modalidades, los cristales de polipéptido de la invención se combinan con aditivos orgánicos líquidos con el objeto de estabilizar los cristales del polipéptido. Tal mezcla se puede caracterizar como una mezcla acuosa orgánica que comprenden n% de aditivo orgánico, donde n está entre 1 y 99 y m% de solución acuosa, en m es 100-n. Ejemplos de aditivos orgánicos incluyen compuestos fenólicos, tales como m-cresolo o fenol o una mezcla de estos, y acetona, metil alcohol, metil isobutil cetona, cloroformo, 1-propanol, isopropanol, 2-propanol, acetonitrilo, 1-butanol, 2-butanol, etil alcohol, ciclohexano, dioxano, etil acetato, dimetilformamida, dicloroetano, hexano, isooctano, metileno cloruro, terc-butil alcohol, tolueno, tetracloruro de carbono, o combinaciones de estos.

Formulaciones Líquidas

Una modalidad de la presente invención está dirigida a una formulación acuosa que permite el almacenamiento estable a largo plazo de una composición farmacéutica en donde un polipéptido TNFR2 cristalino es el ingrediente activo utilizado de la preparación de la composición farmacéutica.

000139

Esta formulación es útil, en parte, por que es más conveniente utilizarla para el paciente, en razón a que esta formulación no requiere ninguna etapa extra tal como rehidratación. Como se utiliza aquí, una solución o formulación líquida pretende significar una preparación líquida que contiene una o más sustancias químicas disueltas en un solvente o mezcla adecuada de solvente mutuamente visibles.

La reconstitución de la disolución de los cristales de polipéptido de las formulaciones de cristal de las composiciones en un amortiguador apropiado o formulación farmacéutica.

Componentes de Formulaciones Farmacéuticas

La presente composición farmacéutica se prepara al combinar, además de un polipéptido TNFR2 cristalino como se describió anteriormente, uno o más de los siguientes tipos de ingredientes o excipientes listados en los párrafos de adelante, muchos o todos los cuales están disponibles de proveedores comerciales. Entenderá un experto en la técnica que al combinar los varios componentes al ser incluidos en la composición pueden ser hechos en un orden apropiado, a saber, el amortiguador se puede agregar primero, en la mitad o al

.. 000131

final y el modificador de tonicidad se puede agregar primero, en la mitad o al final. También se debe entender por un experto en la técnica que alguno de estos químicos pueden ser incompatibles en ciertas combinaciones, y de acuerdo con esto, son fácilmente sustituidos con diferentes químicos que tienen propiedades similares pero son compatibles en la mezcla relevante. Existe conocimiento en la técnica con relación a la adecuabilidad de varias combinaciones de excipientes y otros ingredientes o materiales presentes en, por ejemplo, los recipientes utilizados para almacenar la composición farmacéutica y/o los dispositivos utilizados para la administración terapéutica (ver, por ejemplo, Akers, 2002, *JPharm Sci* 91:2283-2300).

Agentes acidificantes ("medios acidificantes"): ácido acético, ácido acético glacial, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido clorhídrico, ácido clorhídrico diluido, ácido málico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido fosfórico diluido, ácido sulfúrico, ácido tartárico, y otros ácidos adecuados.

Ingredientes activos: ingredientes activos adicionales también se pueden incluir en la composición actualmente descrita, por ejemplo, para reducir la incomodidad del sitio de inyección. Tales ingredientes activos incluyen, pero no

están limitados a drogas antiinflamatorias no esteroideas tales como, por ejemplo, trometamina, en una dosis apropiada.

Propulsores de aerosol ("medios propulsores"): butano, diclorodifluorometano, dicloro-tetrafluoroetano, isobutano, propano, tricloromonofluorometano.

Inhibidores de agregación ("medios de inhibición"): reducen la tendencia de los polipéptidos a asociarse en complejos ternarios o cuaternarios en apropiados o indeseados. Los inhibidores de agregación adecuados incluyen los aminoácidos L-arginina y/o, L-cisteína, que pueden actuar para reducir la agregación de los polipéptidos que contienen un dominio Fc durante largos periodos, por ejemplo, dos años o más. La concentración de inhibidor de agregación de la formulación puede estar entre aproximadamente 1 mM a 1M, o aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, a aproximadamente 15 mM a aproximadamente 75 mM, a aproximadamente 25 mM.

Desnaturalizante de alcohol ("medios desnaturalizantes"): benzoato de denatonio, metil isobutil cetona, octacetato de sucrosa.

000133

Agentes alcalizantes ("medios alcalizantes"): solución de amonio fuerte, carbonato de amonio, dietanolamina, diisopropanolamina, hidróxido de potasio, bicarbonato de sodio, borato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, trolamina.

Agentes antitorta ("medios antitorta"): silicato de calcio, silicato de magnesio, dióxido de silicio coloidal, talco.

Agentes antiespumantes ("medios antiespumantes"): dimeticona, simeticona.

Antioxidantes ("medios antioxidantes") se pueden incluir en las formulaciones de la presente invención. Los antioxidantes contemplados para uso en la preparación de las formulaciones incluyen aminoácidos tales como glicina y licina, agentes quelantes tales como EDTA y DTPA, y absorbedores de radicales libres tales como sorbitol y marital. Los antioxidantes adicionales incluyen ácido ascórbico, ascorbil palmitato, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotio-glicerol, propil galato, bisulfito de sodio, formaldehído sulfoxilato de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, dióxido de azufre, tocoferol, y excipiente de tocoferoles. También se contempla para uso en la inhibición de oxidación el nitrógeno o dióxido de carbono

. 0000134

sobrepuesto. El nitrógeno o dióxido de carbono sobrepuesto pueden ser introducidos en el espacio superior de un frasco o jeringa prellenada durante el proceso de llenado.

Agentes amortiguantes ("formulación de medios amortiguantes")

mantener el pH de la formulación farmacéutica en un rango deseado. Con el pH de la composición farmacéutica se establece en o cerca de niveles fisiológicos, se maximiza la comodidad del paciente luego de la administración. En particular, en ciertas modalidades el pH de una composición farmacéutica está dada dentro del rango de pH aproximadamente 4.0 a 8.4, a un rango de pH de aproximadamente 5.0 a 8.0, a un rango de pH de aproximadamente 5.8 a 7.0 a un rango de pH de aproximadamente 5.8 a 7.4, o aproximadamente 6.2 a 7.0. Se debe entender que el pH se puede ajustar según sea necesario para maximizar la estabilidad y solubilidad del polipéptido en una formulación particular y como tal, un pH por fuera de los rangos fisiológicos, aún tolerable por el paciente, está dentro del alcance de la invención. Varios amortiguadores adecuados para uso en la composición farmacéutica de la composición de la invención incluyen histidina, sales alcalinas (fosfato de sodio o potasio o sus sales de hidrógeno o dihidrógeno), citrato de sodio/ácido cítrico, acetato de sodio/ácido acético, citrato de potasio, ácido maléico, citrato de amonio, acetato de amonio, tris-

. 000135

(hidroximetil)-aminometano (tris), varias formas de acetato y dietanolamina, carbonato de amonio, fosfato de amonio, ácido bórico, ácido láctico, ácido fosfórico, metafosfato de potasio, fosfato monobásico de potasio, solución de lactato de sodio, y cualquier otro agente amortiguante con pH farmacéuticamente aceptable conocido en la técnica. Los agentes para uso de pH tal como ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, o una sal de estos, también se pueden incluir con el fin de obtener el pH deseado. Un amortiguador adecuado es el fosfato de sodio para mantener las composiciones farmacéuticas en o cerca de pH 6.2. En otro ejemplo, el acetato es un amortiguador más eficiente en pH 5 que pH 6 de tal forma que se puede utilizar menos acetato en una solución a pH 5 que a pH 6. La concentración del amortiguador en la formulación puede estar entre aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1M, o aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM.

Agentes quelantes ("medios quelantes", también llamados agentes secuestrantes): edetato de sodio, ácido etilenodiaminotetraacético y sales, ácido edético.

Agentes de recubrimiento ("medios de recubrimiento"): carboximetilcelulosa de sodio, acetato de celulosa, acetato eftalato de celulosa, etilcelulosa, gelatina, esmalte

. 000136

farmacéutico, hidroxipopilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa eftalato, copolímero de ácido metacrílico, etilcelulosa, polietilenglicol, polivinilacetato eftalato, shellac, sucrosa, dióxido de titanio, cera carnauba, cera microcristalina, zein.

Colores ("medios colorantes"): caramelo; eritrosina (FD&C Red No. 3); FD&C No. 40; FD&C Amarillo No. 5; FD&C Amarillo No. 6; FD&C Azul No. 1; rojo, amarillo, negro, azul o mezclas; óxido férrico.

Agentes complejantes ("medios formadores de complejo"): ácido etilenodiaminotetraacético y sales (EDTA), ácido acético, etnolmaido de ácido gentístico, sulfato de oxiquinolina.

Disecantes ("medios disecantes"): cloruro de calcio, sulfato de calcio, dióxido de silicio.

Ayudas de filtración ("medios de filtración"): Celulosa en polvo, tierra silícea purificada.

Sabores y perfumes ("medios saborizantes"): anetol, aceite aniso, benzaldehído, aceite canela, cacao, etilvanilina, mentol, metil salicilato, glutamato de monosodio, aceite de

flor naranja, aceite naranja, pimienta, aceite de pimienta, espíritu de pimienta, aceite de rosa, agua de rosa fuerte, timol, tintura de bálsamo de tolú, vainilla, tintura de vainilla, vanilina.

Humectantes ("medios de retención de humedad"): glicerina, hexilenglicol, propilenglicol, sorbitol.

Bases de ungüento ("medios de ungüento"): Lanolina, lanolina anhidrida, ungüento hidrofílico, ungüento blanco, ungüento amarillo, ungüento de polietilenglicol, petrolato, petrolato hidrofílico, petrolato blanco, ungüento de agua de rosa, esqualeno.

Plastificadores ("medios plastificantes"): aceite de castor, monoglicéridos diacetilados, eftalato de dietilo, glicerina, monoglicéridos mono- y diacetilados, polietilenglicol, propilenglicol, triacetina, trietil citrato.

Membranas de polímero: acetato de celulosa.

Portadores poliméricos ("medios de portador") son polímeros utilizados para la encapsulación de cristales de polipéptido para el suministro del polipéptido, que incluye el suministro biológico, tales polímeros incluyen polímeros biocompatibles

. 000138

y biodegradables. El portador polimérico puede ser un tipo de polímero simple o puede ser un compuesto de una mezcla de tipos de polímero. Los polímeros útiles como el portador polimérico, incluyen por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilato), poli(aminoácido), poli(anhídrido), poli(depsipéptido), poli(ésteres), tal como poli(ácido láctico) o PLA poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(B-hidroxibutirato), poli(caprolactona), y poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli(hidroxipropil)metacrilamida, poli[(órgano)fosfazeno), poli(ortoésteres), poli(vinil alcohol), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico - alquil viniléter, polioles plurónicos, albúmina, polipéptidos naturales y sintéticos, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados o cualquier material convencional que encapsulará los cristales de polipéptido.

Preservativos (o "medios preservantes"), tal como preservativos antimicrobianos, contemplados para uso en las formulaciones de la presente invención, tal como formulaciones multidosis, incluyen cloruro de benzalconio, solución de cloruro de benzalconio, cloruro de benzeltonio, ácido benzoico, benzilalcohol, butilparabeno, cloruro de

cetilpirimidino, clorobutanol, clorocresol, créeselo, ácido dehidroacético, etilparabeno, metilparabeno, metilparabeno, metilparabeno sodio, fenol, feniletilalcohol, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, benzoato de potasio, solvato de potasio, propilparabeno, propilparabeno sodio, benzoato de sodio, dihidroacetato de sodio, propionato de sodio, ácido sórbico, timerosal, y timol. La cantidad de preservativo incluido estará en el rango de 0% a 2% p/v) o aproximadamente 1% (p/v).

Agentes solubilizantes y estabilizadores ("medios solubilizantes" o "medios estabilizantes", también denominados como agentes emulsificantes, co-solutos, o co-solventes) que incrementa la solubilidad del péptido y/o estabilizan el polipéptido mientras que esté en solución (o en forma seca o congelada) también se pueden agregar a una composición farmacéutica. Ejemplos de agentes solubilizantes y estabilizantes incluyen pero no están limitados a azúcares/polioles tales como: sucrosa, lactosa, glicerol, silitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa; polímeros tales como: seroalbúmina (sero albúmina bovina (BSA), SA humana (HSA), o HA recombinante), dextrán, PVA, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polietilenoimina, gelatina, polivinilpirrolidona, (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC); solventes no acuosos tale como: alcoholes polihídricos

000140

(por ejemplo PEG, etilenglicol y glicerol), metilsulfóxido (DMSO), y dimetilformamida (DMF); aminoácidos tales como: prolina, L-metionina, L-serina, ácido glutámico de sodio, alanina, glicina, clorhidrato de lisina, sarcosina, y ácido gamma-aminobutírico, tensoactivos tales como: Tween-80, Tween-20, SDS, polisorbato, copolímero de polioxietileno; y excipientes estabilizantes misceláneos tales como: fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido trimetilamina, betaina, iones de metal (por ejemplo zinc, cobre, calcio, manganeso y magnesio), CHAPS, monolaurato, 2-O-beta-manoglicerato; o cualquiera de los siguientes: acacia, colesterol, dietanolamina (adjunto), monoestearato de glicerol, alcoholes de lanolina, lecitina, mono- y di- glicéridos, monoetanolamina (adjunto), ácido oleico (adjunto), alcohol oleilo (estabilizador), poloxámero, esterato de polioxietileno 50, agente de castor olixilo 35, aceite de castor hidrogenado polioxilo 40, oleiléter polioxilo 10, cetosteariléter polioxilol20, estearato de polioxilo 40, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, diacetato de propilenglicol, monoestearato de polipropilenglicol, laurilsulfato de sodio, estearato de sodio, monolaurato de sorbitán, monooleato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, ácido esteárico, trolamina, cera emulsificante; agentes humectantes

y/o solubilizantes tales como cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, cloruro de cetil piridinio, docusato sodio, monoxinol 9, nonoxinol 10, octoxinol 9, estearato polioxilo 50, tiloxapol; o cualquier combinación de los anteriores. La concentración de los solubilizadores/estabilizadores en la formulación puede estar entre aproximadamente 0.001 y 5% en peso, o aproximadamente 0.1 a 2% en peso. En una modalidad, el estabilizador se selecciona de derivados de sorbitán mono-9-octadecenoato poli(oxi-1,2-etanodiil), que incluye pero no está limitado a, polisorbato 80 o polisorbato 20. La cantidad de polisorbato 20 u 80 a ser utilizado en esta modalidad está en el rango de 0.001% a 0.1% (p/v), tal como 0.005% (p/v), en uso simple o en derivaciones multidosis. En otra modalidad, la L-metionina libre en el rango de 0.05 mM a 50 mM se incluye en la formulación: la cantidad de L-metionina libre es 0.05 mM a 5 mM para formulaciones de uso simple, y 1 mM a 10 mM para formulaciones multidosis.

Solventes ("medios para disolver"): acetona, alcohol, alcohol diluido, amileno hidrato, benzil benzoato, butil alcohol, tetracloruro de carbono, cloroformo, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, etilacetato, glicerina, hexilenglicol, isopropilalcohol, metilalcohol, cloruro de metileno, metilisobutilcetona, aceite mineral, aceite de maní, polietilenglicol, propilencarbonato, propilenglicol, aceite

de sésamo, agua para inyección, agua estéril para inyección, agua estéril para irrigación, agua purificada.

Sorbentes (también denominados adsorbentes, "medios de adsorción"): celulosa en polvo, carbón mineral, tierra silícea purificada; y solventes de dióxido de carbono: lima de hidróxido de bario, lima soda.

Agentes Enriquecedores ("medios enriquecedores"): aceite de castor hidrogenado, cetostearil alcohol, cetil alcohol, cera de cetil ésteres, grasa dura, parafina, excipiente de polietileno, estearil alcohol, cera emulsificante, cera blanca, cera amarilla.

Bases de supositorio ("medios supositorios"): manteca de cacao, cera dura, polietilenglicol.

Agentes de suspensión y/o de incremento de viscosidad ("medios de incrementos de viscosidad"): acacia, agar, ácido algínico, monoestearato de aluminio, bentonita, bentonita purificada, bentonita magma, carbómero 934p, carboximetilcelulosa calcio, carboximetilcelulosa sodio, carboximetilcelulosa sodio 12, carraginan, celulosa de sodio microcristalina y carboximetilcelulosa, dextrina, gelatina, goma guar, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa,

000143

hidroxipropil metilcelulosa, silicato de magnesio aluminio, metilcelulosa, pectina, óxido de polietileno, polivinil alcohol, povidona, alginato propenilglicol, dióxido de silicio, dióxido de silicio coloidal, alginato de sodio, tragacanto, goma xantano.

Agentes endulzantes ("medios endulzantes"): aspartame, dextratos, dextrosa, dextrosa excipiente, fructosa, manitol, sacarina, sacarina de calcio, sacarina de sodio, sorbitol, solución de sorbitol, sucrosa, azúcar comprensible, azúcar de confitura, melaza.

Ligaduras de tableta ("medios de unión de tabletas"): acacia, ácido algínico, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa microcristalina, dextrina, etilcelulosa, gelatina, glucosa líquida, goma guar, hidroxipropil metilcelulosa, metilcelulosa, óxido de polietileno, povidona, almidón pregelatinizado, melaza.

Tableta y/o diluyentes de cápsula ("medios diluyentes"): carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico, fosfato de calcio tribásico, sulfato de calcio, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, dextrina, excipiente de dextrosa, fructuosa, caolín, lactosa, manitol,

.. 000144

sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, sucrosa, azúcar comprensible, azúcar de confitería.

Desintegrantes de tableta ("medios desintegrantes de tabletas"): ácido algínico, celulosa microcristalina, croscarmelosa sodio, crospovidona, potasio polacrilin, almidón glicolato de sodio, almidón, almidón pregelatinizado.

Tableta y/o lubricantes de cápsula ("medios de lubricación"): estearato de calcio, gliceril behenato, estearato de magnesio, aceite mineral ligero, polietilenglicol, esterail fumarato de sodio, ácido esteárico, ácido esteárico purificado, talco, ácido vegetal hidrogenado, estearato de zinc.

Modificadores de Tonicidad ("medios que modifican tonicidad"): son entendidos por ser moléculas que contribuyen a la osmolalidad de una solución. La osmolalidad de una composición farmacéutica es preferiblemente regulada con el fin de maximizar la estabilidad de los ingredientes activos y también minimizar la incomodidad del paciente luego de la administración. El suero es aproximadamente 300+/-50 miliosmolales por kilogramo. Se prefiere generalmente que la composición farmacéutica sea isotónica con suero, es decir, que tenga la misma o similar osmolalidad, que se logre

mediante la adición de un modificador de tonicidad, así se contempla que la osmolalidad sea de aproximadamente 180 a aproximadamente 420 miliosmolales, sin embargo, se debe entender que la osmolalidad puede ser o mayor o menor que las condiciones específicas requeridas. Ejemplos de modificadores de tonicidad adecuados para modificar la osmolalidad incluyen, pero no están limitadas a aminoácidos (por ejemplo arginina, cisteína, histidina, y glicina), sales (por ejemplo cloruro de sodio, cloruro de potasio y citrato de sodio) y/o sacáridos (por ejemplo sucrosa, glucosa, dextrosa, glicerina y manitol). La concentración del modificador de tonicidad de una formulación puede estar entre aproximadamente 1mM a 1M, o aproximadamente 10mM a aproximadamente 200mM. En una modalidad el modificador de tonicidad es cloruro de sodio dentro de un rango de concentración de 0mM a 200mM. En otra modalidad, el modificador de tonicidad es sorbitol o trehalosa y no está presente en cloruro de sodio.

Vehículos ("medios de vehículos"): saborizados y/o endulzados (elixir aromático, elixir de benzaldehído compuesto, elixir iso-alcohólico, agua de pimienta, solución de sorbitol, melaza, melaza de bálsamo de tolú); oleaginosa (aceita de almendra, aceite de maíz, aceite de semilla de maíz, etil oleato, isopropil miristato, isopropil palmitato, aceite mineral, aceite mineral ligero, miristil alcohol,

. 000146

octildodecanol, aceite de oliva, aceite de maní, aceite pérsico, aceite sésamo, aceite de soya, escualeno); portadores de sólido tales como esferos de azúcar; (agua bacteriostática para inyección, inyección de cloruro de sodio bacteriostática) estéril.

Agente repelente de agua ("medios repelentes de agua"): ciclometicona, dimeticona, cimeticona.

En ciertas modalidades, la composición farmacéutica comprende un compuesto seleccionado de lo siguiente, o cualquier combinación de estos: sales de 1) aminoácidos tales como glicina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, asparigina, glutamina, prolina; 2) carbohidratos, por ejemplo monosacáridos tales como glucosa, fructuosa, galactosa, manosa, arabinosa, xilosa, ribosa; 3) disacáridos, tales como, trihalosa, maltosa sucrosa; 4) polisacáridos, tales como maltodextrinas, dextranos, almidón, glicógeno; 5) alditoles, tal como, manitol, xilitol, lacticol, sorbitol; 6) ácido glucorónico, ácido galacturónico; 7) ciclodextrinas, tales como metil ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina y similares; 8) sales inorgánicas, tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, fosfatos de sodio y potasio, carbonato de amonio de ácido bórico y fosfato de amonio; 9) sales orgánicas, tales como acetatos, citrato,

000147

ascorbato, lactato; 10) agentes emulsificantes o solubilizantes como acacia, dietanolamina, gliceril monoestearato, lecitina, monoetanolamina, aceite ácido oléico, oleil alcohol, poloxámero, polisorbato, lauril sulfato de sodio, ácido esteárico, monolaurato de sorbitán, monoestearato de sorbitán y otros derivados de sorbitán, derivados de poliexilo, cera, derivado de polioxietileno, derivados de sorbitán; 11) reactivos que incrementan la viscosidad como, agar, ácido algínico y sus sales, goma guar, pectina, polivinil alcohol, óxido de polietileno, celulosa y sus derivados propilencarbonato, polietilenglicol, hexilenglicol, tiloxapol; y 12) ingredientes particulares tales como sucrosa, trehalosa, lactosa, sorbitol, lactitol, inositol, sales de sodio y potasio tal como acetato, fosfatos, citratos, borato, glicina arginina, óxido de polietileno, polivinil alcohol, polietilenglicol, hexilenglicol, metoxi polietilenglicol, gelatina, hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Formas de liberación sostenida

En una modalidad preferida de la invención, se utilizan formas de liberación sostenida (también denominadas formas "de liberación controlada") de polipéptidos TNFR2 cristalinos son utilizados, incluyendo formas de liberación sostenida de TNFR2: Fc cristalina; formas de liberación sostenida o

.. 000'48

controlada comprenden polipéptido cristalino y una sustancia (los "medios de liberación sostenida") para extender la liberación física o la disponibilidad biológica del polipéptido cristalino durante un período deseado de tiempo. Las formas de liberación sostenida adecuadas para uso en los métodos descritos incluyen, pero no están limitados a, polipéptidos TNFR2 cristalinos que son encapsulados en medios de liberación sostenida tales como polímeros biocompatibles de lenta disolución (por ejemplo, los portadores poliméricos descritos aquí, las micropartículas de alginato descritas en la U.S. 6,036,978, o el polietileno-acetato de vinilo y las composiciones de poli (ácido láctico-glucólico) descritas en la U.S. 6,083,534), mezcladas con tal polímero (que incluye hidrogeles tópicamente aplicados), y o guardados en un implante semipermeable biocompatible. Modalidades adicionales de la invención incluyen formas de liberación sostenida adicionales tales como micropartículas poliméricas, en donde una vez sea del ingrediente activo y medios de liberación sostenida tales como polímeros (por ejemplo, PLGA) están dispersos dentro de una fase continua, y la dispersión resultante es directamente liofilizada para remover agua y solvente orgánicos o aditivos y forman dichos micropartículas (patente U.S. No. 6,020,004); composiciones de gel inyectable se comprenden un polisacárido aniónico biodegradable tal como un alginato éster, un polipéptido y al menos un ión de metal

.. 000149

polivalente unido (patente U.S. No. 6,432,449); matices poliméricas biodegradables inyectables que tienen propiedades de gelificación térmica inversa y opcionalmente gelificación que responde a pH/ propiedades de desgelificación (patente U.S. No. 6,541,0333 y 6,451,346); suspensiones poliol: aceite bicompatibles tal como aquellas en dónde la suspensión comprende poliol en el rango de desde aproximadamente 15% a aproximadamente 30% en peso (patente U.S. No. 6,245,740). Tales formas de liberación son adecuadas para suministro continuo de polipéptidos a través de la administración en la forma de un depósito, en dónde el depósito puede ser un implante, o puede ser en la forma de microesferas inyectables, nanoesferas, o geles. La lista anterior de patentes U.S. (patente U.S. No. 6,036,978; 6,083,534; 6,020,004; 6,432,449; 6,541,033; 6,451,346 y 6,245,740) se incorporan en su totalidad como referencia aquí. Además las formas de liberación sostenida o controlada de polipéptidos cristalinos de la invención comprenden tipos de medios de liberación sostenido tales como aquellos descritos en Kim, C., 2000, "Controlled Release Dosage Form Desing", Techonomic Publishing Co., Lancaster PA, que incluye los siguientes polímeros naturales, (gelatina, ácido algínico de sodio, goma xantano, goma arábica, o chitosan), polímeros semisintéticos o derivados de celulosa (metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa,

. 000159

hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa. Carboximetilcelulosa de sodio, acetato de celulosa, butirato acetato de celulosa, propionato acetato de celulosa, acetatoeftalato de celulosa, o eftalato de hidroxipropilmetil celulosa), y polímeros sintéticos (resinas de intercambio de ión (ácido metacrílico, poliestireno sulfonatado/divinilbenceno), ácido poliacrílico (Carbopol), poli (MMA/MAA) poli (MMA/DEAMA), poli (MMA/EA), poli (eftalato de vinil acetato), poli (vinil alcohol), poli (vinil pirolidona), poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico), poli (ácido láctico/glicólico), polietilenglicol, óxido de polietileno, poli (dimetil silicona), poli (hidroxietil metacrilato), poli (etileno/vinil acetato), poli (etileno-/vinil alcohol), polibutadieno, poli (anhídrido), poli (ortoester), y poli (ácido glutámico)).

Las modalidades adicionales de la invención incluyen cristales de polipéptidos TNFR2 encapsulados en al menos un portador polimérico para formar microesferas en virtud de la encapsulación dentro de la matriz del portador polimérico para preservar su estructura terciaria nativa biológicamente activa, como se describió en la patente U.S. No. 6,541,606, que se incorpora en su totalidad como referencia aquí. Los cristales de polipéptido TNFR2 o las formulaciones de estos para hacer encapsulados son suspendidas en un portador

.. 000151

polimérico tal como PLGA el cual se disuelve en un solvente o aditivo orgánico. Tales cristales de polipéptido TNFR2 encapsulados mantiene la actividad biológica del polipéptido TNFR2 durante un mayor periodo de tiempo que los polipéptidos TNFR2 en solución cuando se almacenan bajo condiciones comparables.

Modalidades Ilustrativas

La formulación puede comprender aproximadamente 25 a 50 mg de polipéptidos TNFR2 o etanercept, en donde el polipéptido TNFR2 o etanercept es reconstituido de formas cristalinas, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM de L-arginina, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM de fosfato de sodio aproximadamente 0.75% a aproximadamente 1.25% de sucrosa, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM de NaCl, a aproximadamente pH 6.0 a aproximadamente pH 7.0. En otra modalidad la L-arginina se puede reemplazar con L-cisteína (a aproximadamente 1 a aproximadamente 500 micromolar) en la formulación. En otra modalidad, el pH puede ser aproximadamente pH 7.0. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende 25 mg/ml de TNFR2 cristalino, aproximadamente 25 mM de L-arginina, aproximadamente 25 mM de fosfato de sodio, aproximadamente 98 mM de cloruro de sodio, y aproximadamente 1% de sucrosa o un pH 6.2. En otra

.. 000152

modalidad, en donde el etanercept cristalino o el etanercept reconstituido de la forma cristalina tiene un nivel mayor biológica por unidad de etanercept que las preparaciones de etanercept no cristalizadas, la formulación puede comprender aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg de etanercept cristalino o etanercept reconstituido de forma cristalina o aproximadamente 15 a aproximadamente 25 mg de etanercept cristalino o etanercept reconstituido de forma cristalina.

Formulaciones de Ensayo para Estabilidad de Polipéptido y Actividad Biológica

En aún otra modalidad, la invención suministra un método para ensayar la estabilidad acelerada de la estabilidad de un polipéptido TNFR2 cristalino en una composición farmacéutica de la invención que comprende las etapas de ensayar la actividad del polipéptido formulado de acuerdo con la invención antes de almacenamiento, es decir, tiempo cero; almacenar la composición a 37° C durante un mes y medir la estabilidad del polipéptido; y comparar la forma de estabilidad del tiempo cero con aquella de el punto de tiempo mensual. Esta información es de ayuda para la eliminación temprana de tandas o lotes que parecen tener buena estabilidad inicialmente, pero que no se almacenan bien durante períodos mayores.

.. 000153

Más aún, la presente composición farmacéutica suministra almacenamiento mejorado de largo plazo de tal forma que el ingrediente activo, por ejemplo, un polipéptido TNFR2 cristalino es estable durante el curso del almacenamiento o en estado líquido o congelado. Como se utiliza aquí, la frase almacenamiento de "largo plazo" se entiende que significa que la composición farmacéutica se puede almacenar durante tres meses o más, durante seis meses o más, y preferiblemente durante un año o más. También se entiende por almacenamiento a largo plazo que la composición farmacéutica se almacena como un líquido a 2-8° C o se congela, por ejemplo, a -20° C o más frío. También se puede contemplar que la composición se puede congelar y descongelar más de una vez. El término "estable" con respecto al almacenamiento a largo plazo se entiende que significa que el polipéptido activo de la composición farmacéutica no pierde más del 20%, o más preferiblemente el 15%, o aún más preferiblemente el 10%, y más preferiblemente el 5% de su actividad relativa a la actividad de la composición al inicio del almacenamiento. La actividad del polipéptido TNFR2 se puede ensayar mediante una cualquiera de un número de ensayos, que incluye ensayos de unión de ligando tal como los ensayos ELISA, en donde el ligando se une a un soporte sólido, preparaciones de ensayo y control de polipéptidos TNFR2 se agregan, y la unión del

000154

polipéptido TNFR2 al ligando se detecta utilizando anticuerpos anti-Ig marcados dirigidos al componente Ig del polipéptido TNFR2. Además, los ensayos tales como aquellos descritos en el ejemplo 6 se pueden utilizar para detectar actividad biológica de los polipéptidos TNFR2 que se unen a TNF, o pueden ser modificados para actividad de ensayo de polipéptidos de TNFR2 que se unen a otros ligandos.

Administración y Dosificación

Como se utiliza aquí, "administración de TNFR2 cristalina" o "administración de polipéptidos TNFR2 cristalinos" significan la administración de una composición farmacéutica que comprende polipéptidos TNFR2 cristalinos, o preparados utilizando polipéptidos TNFR2 cristalinos.

Cualquier ruta eficaz de administración se puede utilizar para administrar terapéuticamente TNFR2 cristalino. Si se inyecta el TNFR2 cristalino se puede administrar, por ejemplo, por vía intraarticular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal, o subcutánea mediante inyección de bolo o mediante infusión continua. Otros medios adecuados de administración incluyen liberación sostenida de implantes, depósitos (implantados o inyectado), supositorios, inhalación de aerosol, gotas de ojos, reparaciones orales,

incluyendo píldoras, melazas, trocisco, o goma de mascar, y preparaciones tópicas tal como lociones, geles, pulverizados, ungüentos, u otras técnicas adecuadas. Cuando el TNFR2 cristalino en combinación con uno o más de otros compuestos biológicamente activos éstos se pueden administrar por las mismas o diferentes rutas, y se puede administrar simultánea, separada o secuencialmente.

Las dosis apropiadas se pueden determinar en ensayos de dosificación estándar, y pueden variar de acuerdo con la ruta de administración escogida. La cantidad y frecuencia de la administración dependerá de tales factores como la naturaleza y severidad de la indicación que está siendo tratada, la respuesta deseada, la edad y condición del paciente, y así sucesivamente. En los siguientes regímenes de dosificación, la cantidad del TNFR2 cristalino administrada se entiende por ser la cantidad de TNFR2 cristalino para composiciones farmacéuticas que comprende TNFR2 cristalino, o la cantidad de polipéptido TNFR2 para composiciones farmacéuticas preparadas utilizando TNFR2 cristalino. En una modalidad de la invención, el TNFR2 cristalino se administra una vez por semana para tratar un desorden médico o condiciones descrita aquí, en otra modalidad se administra al menos dos veces por semana, y en otra modalidad se administra al menos tres veces por semana. Un paciente adulto es una persona que tiene 18

años de edad o más. Si se inyecta la cantidad efectiva del TNFR2 cristalino por dosis de adulto varía desde 1-20 mg/m² de área de superficie de cuerpo, y preferiblemente es de cerca de 5-12 mg/m². Alternativamente, se puede administrar una dosis exacta, cuya cantidad varía de 5-100 mg/dosis. Los rangos de dosis de ejemplo para una dosis exacta a ser administrada mediante inyección subcutánea son 5-25 mg/dosis, 25-50 mg/dosis y 50-100 mg/dosis. En una modalidad de la invención, las varias indicaciones descritas adelante se tratan al administrar una preparación aceptable para inyección que contiene o se prepara de TNFR2 cristalino a 25 mg TNFR2 por dosis, o alternativamente, que contiene 50 mg por dosis. La dosis de 25 mg o 50 mg se puede administrar repetidamente, particularmente para condiciones crónicas. Si se utiliza una ruta de administración diferente de la inyección, la dosis se ajusta apropiadamente de acuerdo con las prácticas médicas estándar. En varios casos, se obtendrá una mejora en la condición del paciente al inyectar una dosis de cerca de 25 mg de TNFR2 cristalino una a tres veces por semana durante un periodo de al menos tres semanas, o una dosis de 50 mg de TNFR2 cristalino una o dos veces por semana durante al menos tres semanas, aunque periodos de tratamiento más largos pueden ser necesarios para inducir el grado deseado de mejora. Para condiciones crónicas incurables, el régimen se puede continuar indefinidamente, con ajustes que

se hacen a la dosis y frecuencia si se juzga necesario por el médico del paciente.

Para pacientes pediátricos (edad 4-17), un régimen adecuado involucra la inyección subcutánea de 0.4 mg/kg de peso corporal, hasta un máximo de 25 mg por dosis de TNFR2 cristalino, administrado mediante inyección subcutánea una o más veces por semana.

Adicionalmente a los pacientes humanos, los polipéptidos TNFR2 cristalinos son útiles en el tratamiento de condiciones médicas como se describe aquí que afligen a animales no humanos, tales como mascotas (perros, gatos, aves, primates, etc.), animales de granjas domésticas (rebaños de caballos, ovejas, cerdos, aves, etc.) o cualquier animal que sufra de una condición comparable a una de las condiciones descritas aquí. En tales instancias, se puede determinar una dosis apropiada de acuerdo con el peso corporal del animal. Por ejemplo, se puede utilizar una dosis de 0.2-1 mg/kg. Alternativamente, la dosis se determina de acuerdo con el área de superficie del animal, una dosis de ejemplo varía de 0.1-20 mg/m² de área de superficie corporal, o más preferiblemente de 5-12 mg/m² de área de superficie corporal. Para animales pequeños, tales como perros o gatos, una dosis adecuada es 0.4 mg/kg de peso corporal. En otra modalidad, el

.. 000158

TNFR2 cristalino (en donde el polipéptido TNFR2 se expresa preferiblemente a partir de genes derivados de las mismas especies según el paciente) se administra mediante inyección u otra ruta adecuada una o más veces por semana hasta que la condición del animal se mejore, o estas se puedan administrar indefinidamente.

En otra modalidad, en donde el polipéptido TNFR2 cristalino o el polipéptido TNFR2 reconstituido de la forma cristalina tienen un nivel mayor de actividad biológica por unidad de polipéptido TNFR2 que las preparaciones de polipéptido TNFR2 no cristalizadas, las dosis dadas por encima se pueden reducir apropiadamente, basados en el grado de incremento de la actividad biológica del polipéptido TNFR2 cristalino. Por ejemplo, las dosis anteriores se pueden reducir a 50% de las anteriores dosis y las dosis varían si la cristalización incrementa la actividad biológica dos veces por unidad de polipéptido TNFR2; en otras modalidades, las dosis se reducen de 10 a 95% de la dosis superior, o de 25 a 75% de la dosis superior, o 60% o 70% u 80% de la dosis superior.

La invención incluye además la administración de TNFR2 cristalino concurrentemente con una o más de otras drogas que se administran al mismo paciente en combinación con la composición farmacéutica que comprende polipéptidos TNFR2

.. 000159

cristalino, o preparado al utilizar polipéptidos TNFR2 cristalino, cada droga se administra de acuerdo con un régimen adecuado para tal medicamento. La "administración concurrente" abarca el tratamiento simultáneo o secuencial con los componentes de la combinación, así como también regímenes en los que las drogas se alternan, o en donde se administra un componente a largo plazo y los otros se administran intermitentemente. Se pueden administrar componentes en la misma composición o en composiciones separadas, y mediante la misma o diferentes rutas de administración.

Usos Terapéuticos

La invención pertenece a métodos para tratar varios desórdenes médicos al administrar polipéptidos TNFR2 cristalinos. Los polipéptidos TNFR2 cristalinos se pueden administrar en combinación con otras moléculas activas biológicamente, mediante una forma ejemplificada mediante, pero no limitada a, la combinación y/o terapias concurrentes descritas aquí. Esta invención suministra compuestos, composiciones, y métodos para tratar un paciente mamífero que incluye un paciente humano, que sufre de un desorden médico. Para propósitos de esta descripción, los términos "mal", "enfermedad", "condición médica", "condición anormal" y

.. 000160

similares se utilizan intercambiablemente con el término "desorden médico".

De acuerdo con esta invención, a los pacientes que tienen desórdenes médicos se les administra una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido TNFR2 cristalino. El polipéptido TNFR2 cristalino puede ser la forma cristalina de un receptor TNF-alfa soluble que se une al TNF-alfa tal como TNFR2:Fc cristalino. Como se utiliza aquí, la frase "administrar una cantidad terapéuticamente efectiva" de un agente terapéutico significa que el paciente se trata con el agente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora sostenida sobre una línea base en al menos un indicador que refleja la severidad del desorden. Una mejora, se considera "sostenida" si el paciente exhibe la mejora en al menos dos ocasiones separadas por una o más semanas. El grado de mejora se determina basado en signos o síntomas y también se pueden emplear cuestionarios de determinaciones que se administran al paciente, tales como cuestionarios de calidad de vida. Varios indicadores que reflejan el alcance de la enfermedad del paciente se pueden evaluar para determinar si la cantidad y el tiempo del tratamiento son suficientes. El valor de la línea base para el indicador escogido o indicadores se establece mediante el examen del paciente antes de la administración de la primera

.. 000161

dosis del etanercept cristalino u otro polipéptido TNFR2 cristalino. Preferiblemente, el examen de la línea base se hace dentro de aproximadamente 60 días de la administración de la primer dosis. Si el polipéptido TNFR2 cristalino está siendo administrado para tratar síntomas agudos, tales como por ejemplo tratar una lesión traumática de rodilla, la primera dosis se administra tan pronto como sea prácticamente posible después de que ha ocurrido la lesión.

Se indujo la mejora al administrar el polipéptido TNFR2 cristalino hasta que el paciente manifiesta una mejora sobre la línea base para el indicador o indicadores escogidos. En el tratamiento de condiciones crónicas, este grado de mejora se obtiene al administrar repetidamente este medicamento durante un periodo de al menos un mes o más, por ejemplo durante uno, dos, o tres meses más, o indefinidamente. Un periodo de una a seis semanas, o aún una dosis única, a menudo es suficiente para tratar condiciones agudas. Para lesiones o condiciones agudas, una dosis única puede ser suficiente. Aunque el alcance de la enfermedad del paciente después de tratamiento puede parecer mejorar de acuerdo con uno o más indicadores, el tratamiento se puede continuar indefinidamente al mismo nivel o en una dosis o frecuencia reducida. Una vez se ha reducido el tratamiento o se ha

000182
162

descontinuado, este puede ser reasumido al nivel original si los síntomas reaparecieran.

En una modalidad, los desórdenes médicos a ser tratados con polipéptidos TNFR2 cristalinos se caracterizan por niveles TNFR-alfa excesivos o anormales. Se ha propuesto que un exceso localizado o sistémico de TNF-alfa contribuye a la progresión de numerosos desórdenes médicos. Por ejemplo, pacientes con falla cardíaca crónica tienen niveles elevados de suero TNF-alfa que han sido mostrados por incrementarse con la progresión de la enfermedad (ver, por ejemplo, Levine et al., *N Eng J Med* 323:236-241, 1990). Una variedad de otras enfermedades se asocia con niveles elevados de TNF-alfa (ver, por ejemplo, Feldman et al., *Transplantation Proceedings* 30:4126-4127, 1998). Se ha sugerido que la supresión del TNF-alfa puede ser benéfico en pacientes que sufren de desórdenes caracterizados por expresión de TNF-alfa excesiva o anormal. Sin embargo, aunque se han hecho progresos al idear tratamientos efectivos para tales enfermedades, se necesitan medicamentos y métodos mejorados de tratamiento.

Se suministran aquí métodos para tratar un número de desórdenes médicos caracterizados por la expresión TNF-alfa anormal al administrar polipéptidos TNFR2 cristalino, tales como la forma cristalina de un receptor TNF-alfa soluble tal

.. 000163

como TNFR2:Fc, durante un periodo de tiempo suficiente para inducir una mejora sostenida en la condición del paciente. Los métodos objeto involucran administrar al paciente una formulación que comprende o se prepara al utilizar, un polipéptido TNFR2 cristalino que es capaz de reducir la cantidad efectiva de TNF-alfa endógeno biológicamente activo, tal como para evitar la unión del TNF-alfa a su receptor de superficie celular (TNFR).

Desórdenes Cardiovasculares

Los desórdenes cardiovasculares son tratables con polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones farmacéuticas de estos, y/o terapias de combinación. Ejemplos de desórdenes cardiovasculares tratables con un polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino incluyen: aneurismas aórticas; arteritis; oclusión vascular, que incluye oclusión arterial cerebral. Complicaciones de cirugía de by-pass coronario; isquemia/repercusión; ataque cardiaco, que incluye enfermedad aterosclerótica del corazón, miocarditis, que incluye miocarditis autoinmune crónica y miocarditis viral, falla cardiaca, que incluye falla cardiaca (CHF), caquexia de falla cardiaca; infarto del miocardio; restenosis después de cirugía de corazón; isquemia miocardial silenciosa; complicaciones post-implantación de dispositivos

000164

de asistencia de ventrículo izquierdo; fenómeno de Raynaud; tromboflebitis; vasculitis, que incluye vasculitis Kawasaki, artritis de célula gigante, granulomatosis Wegener; y púrpura Schoenlein-Henoch.

Adicionalmente, el TNFR2:Fc u otros polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos aquí se pueden utilizar en combinación con terapias de célula madre angiogénica o mieloide para el tratamiento de enfermedad cardiovascular, que incluye cardiomiopatía de origen isquémico o no isquémico, terapia angiogénica post-infarto de miocardio o tratamiento de enfermedad arterial periférica. Células madres útiles para este propósito incluyen células madre mesenquimales y células precursoras endoteliales, tales como aquellas encontradas en bazo, hígado fetal, médula ósea (patente Estadounidense No. 5,486,359; Deisher T, *Drugs* 3(6):649-53 (2000); Huss R, *Stem Cells* 18:1-9 (2000); Huss et al., *Stem Cells* 18:252-60 (2000). Los polipéptidos TNFR2 cristalinos se pueden dar concurrentemente con transplantes de células madre así como también con tratamientos con factores de crecimiento de célula madre diferenciada o proliferativa.

El TNF-alfa y el IL-8 se han implicado como factores quimotácticos en aneurisma aórtica abdominal arterioesclerótica (Szekanecz et al., *Pathobiol* 62: 134-139

(1994)). La aneurisma aórtica abdominal se puede tratar en pacientes humanos al administrar un polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino, que se puede administrar en combinación con un inhibidor de IL-8, tal tratamiento tiene el efecto de reducir la neurovascularización patológica asociada con esta condición.

Los estudios han mostrado que las metaloproteinasas (MMP) son un elemento clave en la remodelación miocárdial y fibrosis. Así, administrar polipéptidos TNFR2 cristalino para inhibir el TNF-alfa y la respuesta inflamatoria en conjunto con la inhibición directa del MMP reducirá, evitará, o reversará, desórdenes tales como la disfunción de la bomba ventricular izquierda. Esto se acompaña mediante una coadministración de un polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino, junto con un inhibidor MMP. Alternativamente, el tratamiento de la disfunción de bomba ventricular izquierda puede involucrar administrar un polipéptido TNFR2 cristalino sin el uso concurrente de un inhibidor MMP.

Cualquiera de los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos o tratamientos de combinación descritos aquí también se pueden utilizar para tratar hiperlipidemia combinada familiar (FCH). El FCH es una dislipidemia caracterizada por la enfermedad cardíaca coronaria prematura. Los pacientes con FCH son

.. 000166

genéticamente defectuosos en su gen TNFR1I, tienen bajos niveles de niveles de TNFR1I en sus cuerpos y parecen hiperresponder a los efectos deletéreos del TNF-alfa endógeno (van Greevenbroek et al., 2000, *Atherosclerosis* 153:1-8). La enfermedad cardíaca coronaria, resistencia a la insulina y obesidad asociada con FCH se puede reducir o evitar al administrar a pacientes con FCH uno cualquiera de los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos aquí, tales como etanercept cristalino o TNFR2:Fc cristalino. Adicionalmente, el tratamiento con polipéptido TNFR2 cristalino para FCH se puede administrar concurrentemente con reducción de grasa dietaria y colesterol y/o con una o más de otras drogas utilizadas para tratar esta condición, que incluyen resinas secuestrantes de ácido de bilis (colestiramina y colestipol), ácido nicotínico, niacina, una droga reductora del colesterol, tal como gengenfibrosil o probucol, o uno de los inhibidores de reductasa HMG-CoA o "estatina", tales como lovastatina o pravastatina. En otro aspecto de la invención, los polipéptidos TNFR2 cristalino se utilizan para tratar pacientes que han elevado los niveles de suero de la proteína C-reactiva (CRP) y quienes están en riesgo para ataque cardíaco aún cuando su colesterol puede ser reducido (Ridker et al., 2001, *New Eng J Med* 344: 1959-1965).

Infecciones y Lesiones

.. 000167

Los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o combinación de terapias de combinación descritas aquí son útiles en medicina para tratar infecciones bacterianas, virales o protozoales, y complicaciones que resultan de estas. Una de tales enfermedades es la *Mycoplasma pneumonia*. Adicionalmente, se suministra aquí el uso de polipéptidos TNFR2 cristalino para tratar SIDA y condiciones relacionadas, tales como complejo de demencia del SIDA, emanaciones asociadas con SIDA, lipidistrofia debida a terapia antiretroviral; y sarcoma de Kaposi. Se suministra aquí el uso de polipéptidos TNFR2 cristalino para tratar enfermedades protozoarias, incluye malaria (que incluye malaria cerebral) y esquistosomiasis. Se suministra adicionalmente el uso de polipéptidos TNFR2 cristalino para tratar leprosum nodosum erythema; meningitis bacterial o viral; tuberculosis, que incluye tuberculosis pulmonar; y neumonitis secundaria para una infección bacteriana o viral. También se suministra aquí el uso de polipéptidos TNFR2 cristalino para preparar medicamentos para tratar fiebres o recaída de nacimiento del piojo, tales como aquellas originadas por *Borrelia recurrentis*. Los polipéptidos TNFR2 cristalinos también se pueden utilizar para preparar un medicamento para tratar condiciones originadas por virus herpes; tal como queratitis estromal herpética, lesiones corneales, y desórdenes de la

.. 000168

córnea inducidas por virus. Adicionalmente, se pueden utilizar polipéptidos TNFR2 cristalinos en el tratamiento de infecciones de papilomavirus humano, así como también en el tratamiento de mononucleosis infecciosa. También se utilizan polipéptidos TNFR2 cristalinos para preparar medicamentos para tratar la influenza, así como también para tratar miopatía y polineuropatía de enfermedad crítica (CIPNM), un síndrome inflamatorio que ocurre ocasionalmente en conjunto con enfermedad séptica prolongada. Los polipéptidos TNFR2 cristalinos objeto también se utilizan para tratar encefalopatía espongiforme transmisible, que se cree se media por priones.

Otro desorden que se puede tratar con cualquiera de los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones farmacéuticas de estos, y/o terapias de combinación es mielopatía (TSP/HAM) asociada con paraparesis/HTLV-1 espástica tropical. Esta enfermedad se origina por la infección con el retrovirus HTLV-1 humano. Recientes estudios han sugerido que el TNF-alfa puede jugar un papel en la toma de glutamato reducida exhibida por las células infectadas con HTLV (Szymocha et al., 2000, *J Virol* 74: 6433-6441). El TSP/HAM es una condición lentamente progresiva de la espina dorsal que origina debilidad y rigidez del músculo en las piernas, a menudo acompañado por una pérdida de sensación en

.. 000169

los pies. Tratamientos conocidos para esta condición incluyen corticosteroides y plasmaféresis. El TSP/HAM se puede tratar con cualquiera de los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos aquí, cualquiera de los cuales se puede administrar concurrentemente con un corticosteroide, plasmaféresis o ambos. Un polipéptido TNFR2 cristalino para tratar TSP/HAM es TNFR2:Fc cristalino. La suficiencia del tratamiento se determina al monitorear el paciente para mejoramiento de la fuerza en las piernas, o una detención del deterioro del paciente o mediante cualesquier otros medios considerados apropiados por el médico del paciente.

Otras condiciones tratables mediante los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación incluyen aquellos que resultan de lesiones a la cabeza o espina dorsal e incluyen hematoma subdural debido a trauma en la cabeza.

Desórdenes Neurológicos, Dolor, y Fiebre

La jaqueca cervicogénica es una forma común de jaqueca que se origina de la disfunción en el área del cuello, y que se asocia con niveles elevados de TNF-alfa, que se cree median una condición inflamatoria que no contribuye al confort del paciente (Martelleti, Clin Exp Rheumatol 18(2 Supp 19): S33-8

(Mar-Apr, 2000)). La jaqueca cervicogénica se puede tratar al administrar polipéptidos TNFR2 cristalinos como se describe aquí, reduciendo por lo tanto la respuesta inflamatoria y el dolor de jaqueca asociado.

Adicionalmente, los polipéptidos TNFR2 cristalinos objeto, composiciones y/o terapias de combinación se utilizan para tratar condiciones de dolor crónico, tales como dolor pélvico crónico, que incluye síndrome de dolor prostatitis/pélvico crónico. Como un ejemplo adicional, los polipéptidos TNFR2 cristalinos, composiciones y/o terapias de combinación de la invención se utilizan para tratar dolor post-herpético.

Los polipéptidos TNFR2 cristalinos, composiciones y/o terapias de combinación son útiles para tratar amiloidosis primaria. Adicionalmente, la amiloidosis secundaria que es característica de varias condiciones también es tratable con polipéptidos TNFR2 cristalinos tales como TNFR2:Fc cristalino, y las composiciones y/o terapias de combinación descritas aquí. Tales condiciones incluyen: enfermedad de Alzheimer, amiloidosis reactiva secundaria, síndrome de Down; y amiloidosis asociada con diálisis. También es tratable con los compuestos, composiciones y/o terapias de combinación de la invención los síndromes de fiebre periódica heredados, que incluyen fiebre mediterránea familiar, síndrome de fiebre

000171

periódica hiperinmunoglobulina D y síndrome periódico asociado con receptor TNF (TRAPS).

Los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones, y/o terapias de combinación adicionalmente son útiles para tratar polineuropatía aguda; anorexia nervosa; parálisis de Bell; síndrome de fatiga crónica; demencia transmisible, que incluye enfermedad Creutzfeld-Jacob; neuropatía desmienilación; síndrome Guillain-Barre; enfermedad de disco vertebral; síndrome de la guerra del Golfo; miastenia gravis; isquemia cerebral silente; desórdenes del sueño, que incluyen narcolepsia y apnea del sueño; degeneración neuronal crónica; y apoplejía, que incluye enfermedades isquémicas cerebrales.

Desórdenes Oncológicos y Hematológicos

Se suministran aquí métodos para utilizar polipéptidos TNFR2 cristalinos, composiciones y/o terapias de combinación para tratar varios desórdenes hematológicos y oncológicos. Por ejemplo, los polipéptidos TNFR2 cristalinos se utilizan para tratar varias formas de cáncer, que incluyen leucemia mielógena aguda, carcinoma nasofaríngeo de virus positivo Epstein-Barr, carcinoma de vejiga de vesícula, glioma, colon, estómago, próstata, célula renal, cánceres de ovario y cervical, cáncer de pulmón (SCLC y NSCLC), que incluye náusea

. 000172

asociada con cáncer, caquexia asociada con cáncer, fatiga, astenia, síndrome paraneoplásico de caquexia e hipercalcemia. Enfermedades adicionales tratables con polipéptidos TNFR2 cristalinos sujetos, composiciones y/o terapias de combinación son tumores sólidos que incluyen sarcoma, osteosarcoma, y carcinoma, tales como adenocarcinoma (cáncer de seno) y carcinoma de célula escamosa. Adicionalmente, los compuestos objeto, composiciones y/o terapias de combinación son útiles para tratar leucemia, que incluyen leucemia mielógena crónica aguda, leucemia linfoblástica aguda o crónica, y leucemia por tricoleucitos. Otras malignidades con potencial metastático invasivo se pueden tratar con los compuestos objeto, composiciones, y/o terapias de combinación que incluyen mieloma múltiple. Cuando se utilizan polipéptidos TNFR2 cristalinos para tratar un tumor, este tratamiento se puede administrar en combinación con anticuerpos objetivo para proteínas de membrana que se expresan en un nivel alto en el tumor particular a ser tratado. Por ejemplo, tumores tales como tumor de seno, ovario, y carcinoma de próstata y otros tumores Her2-positivos, puede ser administrado con TNFR2:Fc cristalino u otros polipéptidos TNFR2 cristalinos en combinación con anticuerpos contra Her2/neu, tales como HERCEPTIN® (Conocido genéricamente como "trastuzumab;" Genentech, Inc.). El cáncer, por ejemplo cáncer de ovario o cáncer de próstata,

000173

puede ser tratado mediante administración concurrente de un polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino, e interferón- γ (Windbichler et al., 2000, *British J Cancer* 82:1138-1144).

Varios desórdenes limfoproliferativos también son tratables con los polipéptidos TNFR2 cristalino, composiciones, y/o terapias de combinación. Estas incluyen, pero no están limitadas a síndrome limfoproliferativo autoinmune (ALPS), leucemia linfoblástica crónica, leucemia por tricoleucitos, leucemia linfática crónica, linfoma de célula T periférica, linfoma linfocítica pequeña, linfoma de célula de manto, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de célula T de virus positivo Epstein-Barr, linfoma histiocítico, enfermedad de Hodgkin, linfoma difuso agresivo, leucemias linfáticas agudas, enfermedad linfoproliferativa gama T, linfoma de célula B cutánea, linfoma de célula T cutánea (es decir, micosis fungoides) y síndrome Sézary.

Adicionalmente, los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación se pueden utilizar para tratar anemias y desórdenes hematológicos que incluyen anemia de enfermedad crónica, anemia aplásica, que incluye anemia aplásica de Fanconi; púrpura trombocitopénica idiopática (ITP); síndromes mielodisplásicos (que incluyen

.. 000174

anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación); metaplasia mielofibrosis/mieloide; y crisis vasoclusiva de célula y crisis vasoclusiva de célula calciforme. Adicionalmente, los polipéptidos TNFR2 cristalinos, tales como TNFR2:Fc cristalinos, son útiles para tratar neutropenia idiopática crónica.

Una combinación de polipéptido TNFR2 cristalino y uno o más factores anti-angiogénesis se pueden usar para tratar tumores sólidos, reduciendo por lo tanto la vascularización que nutre el tejido del tumor. Factores anti-angiogénicos adecuados para tales terapias de combinación incluyen inhibidores IL-8, angiostatina, endostatina, kringle 5, inhibidores de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGA), angiopoyetina-2 u otros antagonistas de angiopoyetina-1, antagonistas del factor que activan plaquetas, y antagonistas de factor de crecimiento de fibroblasto básico. Anticuerpos contra factor de crecimiento endotelial vascular, tal como el anti-VEGF (AVASTIN™, conocido genéricamente como "bevacizumab;" Genentech, Inc.), son útiles para tratamientos de combinación con polipéptidos TNFR2 cristalino tales como TNFR2:Fc.

.. 000175

En una modalidad de la invención, el polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino se administra a pacientes con cáncer en combinación con un inhibidor de proteasoma, que incluye administración a pacientes que sufren de cánceres hematológicos o tumores sólidos. La proteosoma controla la estabilidad de varias proteínas involucradas en el ciclo celular y apoptosis, tales como ciclinas y NF-KappaB (ver, por ejemplo, Schenkeim, 2002, Clin Lymphoma 3: 49-55 y Adams, 2002, Curr Opin Oncol 14:628-634). Los inhibidores de proteasoma pueden inducir apoptosis, y así pueden sintetizar células de cáncer para otros agentes anticancerígenos. Inhibidores de proteasoma de ejemplo para las combinaciones objeto incluyen, por ejemplo, carbobenzoxi-L-Leucil-L-Leucil-L-Leucinal (MG132), clasto-lactacistin beta-lactona (A-G-Scientific, Inc.), carbobenzoxi-L-isoleucil-(gamma)-t-butil-L-glutamyl-L-alanyl-L-leucinal (PSI), N-acetil-leu-leu-noleucinal (ALLN), MLN519 (Millennium Pharmaceuticals), ácido [(1R)-3-metil-1-[[[(2S)-1-oxo-3-fenil-2-[(pirazinilcarbonil)amino]propil]-amino]butil] borónico (PS-341, conocido genéricamente como "bortezomib;" nombre comercial VELCADE®; Millennium Pharmaceutical), y carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-norvalinal (MG115; Affiniti Research Products). Por ejemplo, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de seno, malignidades hematológicas, tales como linfoma o leucemia, u otros tumores

.. 000176

pueden ser tratados concurrentemente con un inhibidor de proteasoma, tal como PS-341, y un polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino o etanercept cristalino.

Efectos colaterales no deseados de ciertas terapias se pueden tratar con polipéptidos TNFR2 cristalinos, tales como TNFR2:Fc cristalino. Tales efectos colaterales en algunos casos se median por niveles de TNF-alfa elevados, así tales pacientes se beneficiarán del tratamiento con un agente que reduce los niveles de TNF-alfa. Por ejemplo, polipéptidos TNFR2 cristalinos tales como TNFR2:Fc cristalino se puede administrar para ayudar a combatir la náusea asociada con quimioterapia y otra náusea inducida por droga. Adicionalmente, los polipéptidos TNFR2 cristalinos se utilizan para tratar el daño de cerebro inducido por la radiación asociada con el tratamiento por radiación para tumores de cerebro. Adicionalmente, se utilizan polipéptidos TNFR2 cristalinos para tratar la toxicidad asociada con la administración de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos presentes en la superficie de clases particulares de células de cáncer. Por ejemplo, los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos aquí se pueden utilizar para tratar la toxicidad asociada con la infusión de CAMPATH 1-H® (Conocido genéricamente como "alemtuzumab;" Berlex Laboratorios; ver

. 000177

también EP 0328404A1), que se utiliza para tratar leucemia linfocítica crónica. El CAMPATH 1-H es un anticuerpo humanizado específico para CD52, un antígeno de superficie celular encontrado en monocitos, células B y células T. En otra modalidad de la invención, los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, tales como TNFR2:Fc cristalino o etanercept cristalino, se pueden administrar para mejorar el desorden de respuesta autoinmune relacionado con tratamiento de interferón a largo plazo.

Un polipéptido TNFR2 cristalino se puede administrar a pacientes con cáncer para reducir los efectos colaterales no deseados asociados con la administración de interferón a largo plazo, que puede incluir fiebre, fatiga, neutropenia, salpullido, jaqueca, desórdenes digestivos, desbalance de enzima de hígado y así sucesivamente. Ejemplo, el interferón γ (IFN γ) se ha mostrado por ser activo en el cáncer de ovario, así un paciente con cáncer de ovario se puede tratar mediante la administración concurrente de IFN γ y un polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino, o etanercept cristalino. De forma similar se utiliza a menudo el IFN γ para tratar leucemia mielógena crónica, carcinoma de célula basal, leucemia por tricoleucitos, cáncer de vejiga, hemangiomas de infancia y niñez, mieloma múltiple, sarcoma de kaposi, fungoides micosis, linfoma non-Hodgkin y carcinoma de célula

.. 000178

renal y puede ser administrado concurrentemente con un polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino, para reducir los efectos colaterales inducidos por el interferón.

Adicionalmente, los polipéptidos TNFR2 cristalino se pueden utilizar para evitar el desarrollo de o aliviar la resistencia a la droga para agentes que se unen mediante glicoproteína alfa-1-ácido (AGP), una proteína que es capaz de unirse a moléculas pequeñas y que preferencialmente se unen a moléculas básicas. El AGP es una proteína de fase aguda que se llega a incrementar en una variedad de condiciones patológicas, que incluyen inflamación crónica, infarto del miocardio. El STI 571 (Glivec®, genéricamente conocido como "imatinib;" Novartis) es un inhibidor activo de la actividad de quinasa C-kit, y es útil para tratar leucemia mielógena crónica (CML). Un estudio de modelo de ratón de CML ha mostrado que el AGP se une e inactiva el imatinib, resultando así en una resistencia a esta droga (Gambacorti-passerini et al., 2000, *J Natl Can Inst* 92: 1641-1650). El nivel de AGP en un paciente puede ser reducido mediante la administración de pentoxifilina (Voisin et al., 1998, *Am J Physiol* 275:R1412-R1419). La invención sujeto suministra métodos para evitar o reducir la resistencia al imatinil mediante la administración concurrente de un polipéptido

.. 000179

TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino o etanercept cristalino a un paciente CML quien está experimentando tratamiento con imatinib. El UCN-01 (7-hidroxistaurosporina), un agente utilizado para tratar tumores gastrointestinales y otros tumores sólidos, también tiene una propensión para unirse al AGP (Senderowicz et al., 2000, J Natl Cancer Inst 92(5): 376-387); Noriaki et al., 2000, Biol Pharmac Bull 23(79): 893-895; Fuse et al., 1999, Cancer Res 59(5): 1054-1060; Tamura et al., 1999, Proc Annu Mee Am Soc Clin Oncol 18:A611). Se suministra aquí un método para evitar o reducir la unión UCN-01 a AGP al administrar un polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino, a un paciente con cáncer gastrointestinal quien está siendo tratado concurrentemente con UCN-01 mejorando por lo tanto la efectividad del tratamiento UCN-01. Alternativamente, pacientes que reciben imatinib o UCN-01 se pueden tratar mediante la administración concurrente de un inhibidor IL-1 o un polipéptido TNFR2 cristalino junto con un inhibidor IL-1, tal como uno de los inhibidores IL-1 descritos en la WO 01/87328, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Por estos métodos se puede administrar el polipéptido TNFR2 cristalino una o más veces por semana, por ejemplo, uno, dos o tres veces por semana. Un modo adecuado de administración para el polipéptido TNFR2 cristalino es mediante inyección subcutánea. Cuando el paciente es un

. 000180

adulto, la dosis adecuada para el polipéptido TNFR2 cristalino inyectado incluye 5-12 mg/m² de superficie de área corporal, o 25 mg o 50 mg por dosis. Si el paciente es un paciente pediátrico el polipéptido TNFR2 cristalino se puede administrar mediante inyección subcutánea una o más veces por semana en una dosis de 0.4/kg de peso corporal, hasta un máximo de 25 mg por dosis.

Desórdenes Pulmonares

Un número de desórdenes pulmonares también se puede tratar con los polipéptidos TNFR2 cristalinos, composiciones y/o terapias de combinación. Una de tales condiciones es el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), que se asocia con TNF-alfa elevado y se puede activar mediante una variedad de causas, que incluyen exposición a químicos tóxicos, pancreatitis, trauma u otras causas. Los compuestos descritos, composiciones y/o terapias de combinación de la invención también son útiles para tratar displasia broncopulmonar (BPD); linfangio-leiomatosis; hipertensión pulmonar; enfermedad de pulmón fibrótico crónico de infantes prematuros; y bronquioectasis idiopática. La bronquioectasis idiopática es una enfermedad en la cual los neutrófilos median la degradación del componente proteoglican de la matriz bronquial. Los mediadores proinflamatorios en las

.. 000181

secreciones bronquiales de los pacientes bronquiectasis, particularmente TNF-alfa se sospecha que mejoran la acción degradadora de estos neutrófilos (Shum et al., Am J Respir Crit Care med 162:1925-31 (2000)). La presente invención suministra tratamiento para bronquiectasis idiopática que comprende administrar un polipéptido TNFR2 cristalino, tal como un TNFR2:Fc cristalino. Adicionalmente, los compuestos, composiciones y/o terapias de combinación de la invención se utilizan para tratar enfermedad ocupacional del pulmón, que incluye asbestosis, neumoconiosis del trabajador del carbón, silicosis, o condiciones similares asociadas con exposición a largo plazo de partículas finas. En otros aspectos de la invención, los compuestos descritos, composiciones, y/o terapias de combinación, se utilizan para tratar desórdenes pulmonares, que incluye enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) asociada con bronquitis crónica o enfisema; enfermedad del pulmón fibrótico, tal como fibrosis cística, fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis pulmonar inducida por radiación; sarcoidosis, que incluye sarcoidosis pulmonar; y alergias que incluyen rinitis alérgica, dermatitis de contacto, dermatitis atópica y asma.

La fibrosis cística es una condición caracterizada primariamente por la acumulación de moco espeso, que predispone al paciente a infecciones de pulmón crónicas y

.. 000182

obstrucción del páncreas, que resulta en mala absorción de nutrientes y mal nutrición. Los polipéptidos TNFR2 cristalinos se pueden utilizar para tratar fibrosis cística. Si se desea, el tratamiento con polipéptidos TNFR2 cristalinos se pueden administrar concurrentemente con corticosteroides, agentes adelgazantes del moco tales como desoxirribonucleasa 1 recombinante inhalada (tal como PULMOZIMA® o TOBI® u otros tratamientos para fibrosis cística. Los polipéptido TNFR2 cristalinos solo o en combinación con IFN γ -1b se pueden administrar junto con otros tratamientos actualmente utilizados para tratar enfermedad del pulmón fibrótico. Tales tratamientos adicionales incluyen glucocorticoides, azatioprina, ciclofosfamida, penicilamina, colchisina, oxígeno complementario y así sucesivamente. Pacientes con enfermedad de pulmón fibrótico, tales como IPF, a menudo presentes con tos no productiva, disnea progresiva, y muestran un patrón ventilatorio restrictivo en los ensayos de función pulmonar. Las radiografías de pecho revelan acumulaciones fibróticas en los pulmones de los pacientes. Cuando se trata la enfermedad de pulmón fibrótica de acuerdo con los métodos descritos, la suficiencia del tratamiento se puede detectar al observar una reducción en la tos del paciente (cuando la tos está presente), o al utilizar ensayos de función de pulmón estándar para detectar las mejoras en la capacidad total del pulmón, capacidad vital, volumen residual

.. 000183

de pulmón, o al administrar una determinación de gas de sangre arterial que mide la desaturación bajo condiciones de ejercicio, y que muestra que la función del pulmón del paciente ha mejorado de acuerdo con uno o más de estas mediciones. Adicionalmente, la mejora del paciente se puede determinar a través de resultados de radiografía de pecho que muestran que la progresión de la fibrosis en los pulmones de los pacientes ha llegado a ser detenida o reducida. Adicionalmente, los polipéptidos TNFR2 cristalinos son útiles para tratar fibrosis de órgano cuando se administra en combinación con relaxin, una hormona que subregula la producción de colágeno inhibiendo así la fibrosis, o cuando se da en combinación con agentes que bloquean la actividad fibrogénica del TGF- β . Las terapias de combinación que utilizan el polipéptido TNFR2 cristalino y la relaxina humana recombinante son útiles, por ejemplo, para tratar esclerosis sistémica o enfermedad del pulmón fibrótico, que incluye fibrosis cística, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por radiación, y fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

Desórdenes de Piel y Reumáticos

Otras modalidades suministran los métodos para utilizar Los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o

000184

terapias de combinación para tratar una variedad de desórdenes reumáticos. El uso de los inhibidores TNF-alfa en el tratamiento de artritis reumatoide se revisa en Moreland, L.W., 1991, J Rheumatol 26 Supp 57: 7-15, y el uso de los inhibidores TNF-alfa en el tratamiento de espondiartropatía y espondilitis anquilosante se describen en Schnarr et al., Clin Exp Rheumatol 20 (Supp. 28): S126-129 y en Gorman et al., 2002, N Engl J Med 346 (18): 1349-1356, respectivamente. Las condiciones que se pueden tratar con Los polipéptidos TNFR2 cristalinos, composiciones y/o terapias de combinación incluyen: artritis reumatoide adulto y juvenil; lupus sistémico eritematoso; gota; osteoartritis; polimialgia reumática; espondiloartropatías seronegativas, que incluyen espondilitis anquilosante; y enfermedad de Reiter (artritis reactiva). Los polipéptidos TNFR2 cristalinos objeto, composiciones, y/o terapias de combinación se utilizan también para tratar artritis soriática y artritis Lime crónica; el uso de inhibidores TNF-alfa en el tratamiento de artritis soriática se describe en Ruderman, E.M., 2002, Am J Manag Care 8: S171-S180 y en Salvarani et al., 2002, Clin Exp Rheumatol 20 (Suppl.28):S71-S75. También tratable con estos compuestos, composiciones, y/o terapias de combinación son la enfermedad de Still y uveitis asociada con artritis reumatoide. Adicionalmente, los compuestos, las composiciones y/o terapias de combinación de la invención se utilizan en el

tratamiento de desórdenes que resultan en la inflamación del músculo voluntario, que incluye dermatomiositis y polimiositis. Más aún, los compuestos, composiciones y/o combinaciones descritas aquí se utilizan para tratar miositis de cuerpo de inclusión sorádica, ya que el TNF-alfa puede jugar un papel importante en la progresión de la enfermedad de este músculo. Adicionalmente, los compuestos, composiciones y/o combinaciones descritas aquí se utilizan para tratar reticuloistiocitosis multicéntrica, una enfermedad en la que la destrucción de la articulación y los nódulos papulares de la cara y manos se asocian con el exceso de producción de citoquinas proinflamatorias mediante células gigantes multinucleadas. Los polipéptidos TNFR2 cristalinos, composiciones y/o terapias de combinación de la invención se pueden utilizar para inhibir quemaduras hipertróficas, un fenómeno que se cree resulta en parte de la secreción excesiva de TNF-alfa. Los polipéptidos TNFR2 cristalinos se pueden administrar solos o concurrentemente con otros agentes que inhiben la quemadura hipertrófica, tales como inhibidores del TNF-alfa.

Desórdenes que involucran las membranas de la piel o la mucosa también son tratables al utilizar los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación. Tales desórdenes incluyen enfermedades

· 000186

acantolíticas, que incluye enfermedad Darier, queratosis folicular, y pemphigus vulgaris. También tratable con polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación son acné; acné rosácea; alopecia areata; estomatitis aftosa, bolo pemfigoide; quemaduras; dermatitis herpetiforme; eczema; eritema, que incluye eritema multiforme y eritema multiforme bulloso (Síndrome Stevens-Johnson); enfermedad inflamatoria de la piel; lichen planus; enfermedad bullosa lineal IgA (dermatosis bullosa crónica de niñez); pérdida de la elasticidad de la piel; úlcera de la superficie de la mucosa; dermatitis neutrofílica (Síndrome Sweet); pitiriasis rubra pilaris; soriasis; pioderma gangrenoso; y necrólisis epidermal tóxica.

En otra modalidad, los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos se utilizan para tratar y prevenir la recurrencia de lipodermatoesclerosis y úlceras venosas crónicas, que muy a menudo se ubican en las piernas. Estudios han demostrado que el TNF-alfa puede contribuir a la patogénesis de lipodermatoesclerosis y úlceras venosas crónicas mediante la activación de la matriz (MMP2) metaloproteinasa 2, y al inducir la producción de TGF α y otras citoquinas. La oxpentifilina y pentoxifilina han mostrado ser efectivas en esta configuración. Los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, que incluyen TNFR2:Fc cristalino o etanercept

000187

cristalino, se pueden utilizar para tratar úlceras venosas crónicas solas o en combinación con oxpentifilina, pentoxifilina, GM-CSF, leptina, PDGF, bFGF, EGF, TGF, y/o IGF. Estos tratamientos acelerarán la curación y evitarán recurrencias. La administración puede ser sistémica o local. Para la administración local el polipéptido TNFR2 cristalino se aplica tópicamente en un ungüento, loción, gel o crema, o se inyecta perilesionalmente en o dentro de cerca de 10 centímetros de la úlcera.

Desórdenes Adicionales

También se utilizan métodos para suministrar polipéptidos TNFR2 cristalinos, composiciones y/o terapias de combinación para tratar varios desórdenes del sistema endocrino. Por ejemplo, los polipéptidos TNFR2 cristalinos se utilizan para tratar ataque de diabetes juvenil (que incluye tipo de diabetes dependiente de insulina y autoinmune) y también para tratar ataque de diabetes madura (que incluye diabetes mediada por obesidad y no dependiente de insulina). Adicionalmente, los compuestos objeto, composiciones, y/o terapias de combinación se utilizan para tratar condiciones secundarias asociadas con diabetes, tales como retinopatía diabética, rechazo de transplante de riñón en pacientes diabéticos, resistencia a la insulina mediada por la obesidad

y falla renal, que en si mismo se puede asociar con proteinúrea e hipertensión. Otros desórdenes endocrinos también son tratables con estos compuestos, composiciones y/o terapias de combinación que incluyen enfermedad de ovario policístico, adrenoleucodistrofia ligada-X, hipotiroidismo, y tiroiditis, que incluye tiroiditis Hashimoto (es decir, tiroiditis autoinmune).

Los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, tales como TNFR2:Fc, composiciones y/o terapias de combinación se utilizan adicionalmente para tratar combinaciones del hígado tales como hepatitis, que incluyen hepatitis alcohólica aguda, hepatitis viral o inducida por droga aguda, hepatitis A, B y C, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmune, hipertensión de portal idiopático, e inflamación del hígado debido a causas desconocidas. Las anteriores enfermedades del hígado se pueden tratar con un polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc, actualmente con otras medicaciones utilizadas para tratar las mismas condiciones. Como un ejemplo, los polipéptidos TNFR2 cristalinos se pueden utilizar para tratar hepatitis C, que incluye hepatitis C crónica, en pacientes que son concurrentemente tratados con interferón-alfa (IFNalfa). La alta expresión del TNF-alfa en el hígado interfiere con la acción del IFNalfa, interfiriendo así con la respuesta del paciente al tratamiento IFNalfa

.. 000189

(Hong et al., 2001, FASEB J 15: 1595-1597). Los tratamientos que se pueden administrars concurrentemente con los polipéptidos TNFR2 cristalinos para tratar hepatitis C incluye IFNalfa pegilada, ribavirina, o una combinación de ribavirina e interferón-alfa o interferón-alfa pegilado. Las porciones de interferón-alfa adecuadas para uso concurrente con polipéptidos TNFR2 cristalinos incluye IFNalfa-2a (tales como ROFERON®; Hoffmann-LaRoche), IFNalfa-2a pegilado (tal como PEGASYS®; Hoffmann-LaRoche), y IFNalfa-2a pegilado o -2b como se describe en US20020127203A1, o los conjugados IFNalfa pegilados descritos en WO 9964016. En otra modalidad, la hepatitis C se puede tratar mediante administración concurrente de interferón-alfa y un polipéptido TNFR2 cristalino diferente de TNFR2:Fc cristalino, tal como formas cristalinas de lenercept u onercept.

Condiciones del sistema gastrointestinal también son tratables con polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación, que incluyen enfermedad celiaca; el uso de inhibidores TNF-alfa en el tratamiento de la enfermedad de Crohn se describe en Ricart et al., 2002, *Drugs of Today* 38 (11): 725-744. Adicionalmente, los compuestos, composiciones y/o terapias de combinación de la invención se utilizan para tratar la enfermedad de Crohn; náusea asociada con los desórdenes

000190

gastrointestinales u otros desórdenes sistémicos; colitis ulcerativa; gastropáresis idiopática; colelitiasis (cálculos de la vesícula); pancreatitis, que incluye pancreatitis crónica y lesión de pulmón asociada con pancreatitis aguda; y úlceras, que incluyen úlceras gástricas y duodenales.

También se incluyen métodos para utilizar los polipéptidos TNFR2 cristalinos objeto, composiciones y/o terapias de combinación para tratar desórdenes del sistema genitourinario, tal como glomerulonefritis, que incluye glomerulonefritis autoinmune, glomerulonefritis debido a exposición debido a toxinas o glomerulonefritis secundaria a infecciones con estreptococi hemolítico u otros agentes infecciosos. También tratables con los compuestos, composiciones y/o terapias de combinación de la invención son el síndrome urémico y sus complicaciones clínicas (por ejemplo, falla renal, anemia y cardiopatía hipertrófica) que incluye síndrome urémico asociado con exposición a toxinas ambientales, drogas u otras causas. Condiciones adicionales tratables con los compuestos, composiciones y/o terapias de combinación de la invención son complicaciones de hemodiálisis, condiciones de próstata, que incluyen hipertrofia prostática benigna, prostatitis no bacteriana y prostatitis crónica; y complicaciones de hemodiálisis.

.. ~~00019~~ (R)

Adicionalmente, los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación se utilizan para tratar varios desórdenes que involucran pérdida auditiva, tal como aquellos que se asocian con la expresión TNF-alfa anormal. Uno de estos es el oído interno o pérdida auditiva asociada con el nervio coclear que se cree resulta de un proceso autoinmune, es decir, pérdida auditiva autoinmune. Esta condición actualmente se trata con esteroides, metotrexato y/o ciclofosfamida, que se puede administrar concurrentemente con TNFR2:Fc cristalino u otro polipéptido TNFR2 cristalino. También tratable con los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación es colesteatoma, un desorden del oído medio, asociado a menudo con pérdida auditiva.

Adicionalmente, la invención objeto suministra polipéptidos TNFR2 cristalinos, composiciones y/o terapias de combinación para el tratamiento de condiciones médicas no artríticas de los huesos y de las articulaciones. Esto abarca desórdenes osteoclasto que conducen a pérdida de hueso, tal como pero no limitado a osteoporosis, que incluye osteoporosis postmenopáusica, periodontitis que resulta en aflojamiento o pérdida de dientes y aflojamiento de prótesis después de reemplazo articular (generalmente asociado con una respuesta inflamatoria a usar residuos). Esta última condición también

.. 000192

se llama "osteolisis de implante ortopédico". Otras condiciones tratables al administrar polipéptidos TNFR2 cristalinos tales como TNFR2:Fc cristalino incluye disfunción mandibular articular temporal (TMJ) y pérdida de hueso debido a hipercalcemia de cáncer que incluye metástasis al hueso, tal como, por ejemplo, puede ocurrir en melanoma o carcinoma de pulmón, seno, pulmón, carcinoma celular escamoso, cáncer de cuello y cabeza, cáncer renal, o cáncer de próstata.

Desórdenes asociados con transplante también son tratables con los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación, tales como enfermedad de huésped versus injerto, y otras complicaciones que resultan de transplante de órgano sólido que incluye transplante de corazón, hígado, pulmón, piel, riñón y otros órganos. Tales polipéptidos TNFR2 cristalinos se pueden administrar, por ejemplo, para evitar o inhibir el desarrollo de bronquiolitis obliterana, tal como bronquiolitis obliterana después de transplante de pulmón y bronquiolitis obliterana que origina neumonía. Pacientes que sufren de transplante de célula madre hematopoyética autóloga en la forma de transplante de célula madre sanguínea periférica puede desarrollar "síndrome de injerto" o "ES", que es una respuesta autolimitada generalmente y adversa que ocurre cerca del tiempo del injerto hematopoyético que puede

- 000193

resultar en deterioro pulmonar. El ES se puede tratar con inhibidores de IL-8 o TNF-alfa (tal como TNFR2:Fc cristalino u otros polipéptidos TNFR2 cristalinos), o con una combinación de inhibidores contra ambas de estas citoquinas. Los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos también son útiles para tratar o evitar la falla de injerto, tal como rechazo de injerto de médula ósea o falla del cuerpo receptor a aceptar otro tipo de injertos, tales como trasplante de córnea, o tales como hígado u otros trasplantes de órganos sólidos, en el cual el rechazo del injerto se acompaña a menudo por niveles elevados de TNF-alfa e IL-10. El rechazo del injerto se puede tratar con una combinación de polipéptido TNFR2 cristalino y un inhibidor IL-10.

También son tratables los desórdenes oculares con los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación, que incluyen separación de retina regmatógena, y enfermedad inflamatoria del ojo, y enfermedad inflamatoria del ojo asociada con consumo cigarrillo así como también con degeneración macular asociada con consumo cigarrillo o asociada con la vejez.

Los polipéptidos TNFR2 cristalinos tales como TNFR2:Fc cristalino, las composiciones y/o terapias de combinación descritas aquí son útiles para tratar desórdenes que afectan

.. 000194

el sistema reproductor femenino. Ejemplos incluyen, pero no están limitados a, falla de múltiples implantes/fertilidad; síndrome de pérdida fetal; pérdida de embrión IV humano (aborto espontáneo); embarazo preecláptico o eclampsia; y endometriosis. .

Adicionalmente, los desórdenes de polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación son útiles para tratar la obesidad, que incluye tratamiento para llevar a una reducción en la formación de leptina, o ganancia de peso asociada con el uso de medicamentos antidepresivos. También, los compuestos, composiciones, y/o terapias de combinación de la invención se utilizan para tratar dolor neurogénico, ciática, síntomas de envejecimiento, reacciones severas a drogas, (por ejemplo, toxicidad Il-2 o neuropatía inducida por bleomicina y fibrosis), o suprimir la anterior respuesta inflamatoria, durante, después de la transfusión de células sanguíneas en cirugía cardíaca, u otra cirugía, o en el tratamiento de una lesión traumática a un miembro o articulación, tal como lesión traumática de rodilla. Varios otros desórdenes médicos tratables con polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos, composiciones y/o terapias de combinación incluyen; esclerosis múltiple, síndrome Behcet; síndrome Sjogren; anemia autoinmune hemolítica; beta talasemia; esclerosis

.. 000195

amiotrófica lateral (enfermedad Lou Gehrig); enfermedad de Parkinson; y tenosinovitis de origen desconocido, así como también varios desórdenes autoinmunes o enfermedades asociadas con deficiencias hereditarias. Adicionalmente, los polipéptidos TNFR2 cristalinos objeto, composiciones y/o terapias de combinación se utilizan para tratar condiciones hereditarias tales como la enfermedad de Gaucher, enfermedad de Huntington, enfermedad linear IgA, y distrofia muscular.

En aún otra modalidad de la invención, los polipéptidos TNFR2 cristalinos descritos aquí se utilizan para tratar desorden de espectro de autismo y otros desórdenes del desarrollo pervasivo. Se ha mostrado que las citoquinas proinflamatorias, que incluyen TNF-alfa e IL-1 se producen en un subconjunto de pacientes autísticos, lo que indica que estos pacientes tienen respuestas inmunes innatas excesivas y/o reducción aberrante de citoquinas regulatorias para respuestas de células T. Así, se suministran aquí métodos para tratar desorden de espectro de autismo al administrar un polipéptido TNFR2 cristalino tal como TNFR2:Fc cristalino.

Terapias de Combinación Adicional

Varios otros medicamentos utilizados para tratar las enfermedades descritas aquí también se pueden administrar

.. 000196

concurrentemente con composiciones que comprenden TNFR2 cristalino, o composiciones preparadas utilizando TNFR2 cristalino. Tales medicamentos incluyen: antivirales; antibióticos; analgésicos; drogas no esteroideas anti-inflamatorias (NSAIDS); drogas antirreumáticas que modifican la enfermedad (DMARD); corticosteroides; esteroides tópicos, esteroides sistémicos, (por ejemplo, predmisonas); citoquinas; antagonistas de citoquinas inflamatorias; proteínas de superficie de célula T contra anticuerpos; retinoides oral; ácido salesílico e hidroxiúrea. Analgésicos adecuados para tales combinaciones incluyen: acetaminofén, codeína, napsylato propoxifeno, clorhidrato de oxicodona, bitartrato de hidrocodona, y tramadol. NSAID adecuado para los tratamientos objeto incluyen: ácido salisílico (aspirina) y derivados de salicilato; ibuprofeno; indometacina; celecoxib (CELEBREX®); rofecoxib (VIOXX®); valdecoxib (BEXTRA®); quetorolac; nambumetona; piroxicam; naproxen; oxaprozin; sulindac; quetoprofen; diclofenac; y otros inhibidores COX-1 y COX-2, derivados de ácido propiónico, derivados de ácido acético, derivados de ácido fumárico, derivados de ácido carboxílico, derivados de ácido butírico, oxican, pirazoles y pirazolonas, que incluyen anti-inflamatorios nuevamente desarrollados. DMARD adecuados para tales combinaciones incluyen: azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, sulfato de hidroxiclороquina, metotrexato,

.. 000197

leflunomida, minociclina, penicilamina, sulfasalasina, y compuestos de oro tal como oro oral, tiomalato de sodio oro y aurotioglucosa. Ejemplos de inhibidores de citoquina que se pueden utilizar en combinación con TNFR2 cristalino incluyen, por ejemplo, antagonistas de TGB β , de IL-6, o de IL-8. También se pueden administrar polipéptidos TNFR2 cristalinos en combinación con las citoquinas GM-CSF, IL-2, y/o inhibidores de proteína quinasa A tipo 1 para mejorar la proliferación de células T en pacientes infectados con HIV quienes reciben terapia antiretroviral. Adicionalmente, los polipéptidos TNFR2 cristalino se pueden combinar con inhibidores de IL-13 para tratar la enfermedad de Hodgkin. Los factores de crecimiento nervioso también se pueden combinar con polipéptidos TNFR2 cristalino para tratar ciertas condiciones. Tales condiciones incluyen enfermedades neurodegenerativas, lesión de espina dorsal y esclerosis múltiple. Otras condiciones tratables con esta combinación son glaucoma y diabetes. Adicionalmente, los polipéptidos TNFR2 cristalino se pueden administrar en combinación con antimalarios o colchicina.

Otros compuestos adecuados para tratar las enfermedades descritas aquí en combinación con polipéptidos TNFR2 cristalino incluyen moléculas pequeñas tales como talidomida o análogos de talidomida, pentoxifilina, o inhibidores de

.. 000198

matriz metaloproteinasa (MMP) u otras moléculas pequeñas. Inhibidores de MMP adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en las patentes U.S. No. 5,883,131, 5,863,949, y 5,861,510 así como también los compuestos mercapto alquil peptidilo descritos en la Patente U.S. 5,872,146. Otras moléculas pequeñas capaces de reducir la producción de TNF-alfa, incluyen, por ejemplo, las moléculas descritas en las Patentes U.S. No. 5,508,300, 5,596,013, y 5,563,143, cualquiera de las cuales se puede administrar en combinación con los polipéptidos TNFR2 cristalino. Moléculas adicionales útiles en combinación con los polipéptidos TNFR2 cristalino para tratar las enfermedades descritas aquí incluyen los inhibidores MMP que se describen en la U.S. 5,747,514, U.S. 5,691,382, así como también los derivados de ácido hidroxámico descritos en la U.S. 5,821,262. Las enfermedades descritas aquí también se pueden tratar con terapias de combinación que incluyen moléculas pequeñas que inhiben fosfodiesterasa IV y la producción de TNF-alfa, tal como derivados de oxima sustituida (WO 96/00215), sulfonamidas quinolina (U.S. 5,834,485), derivados de aril furano (WO 99/18095) y derivados heterorobocíclicos (WO 96/01825; GB 2 291 422 A). También útiles en combinación con los polipéptidos TNFR2 cristalino son los derivados de tiazolo que suprimen el TNF-alfa y el IFN γ (wo 99/15524), así como también derivados de

000199

xantina que suprimen el TNF-alfa y otras citoquinas proinflamatorias (ver, por ejemplo, U.S. 5,118,500, U.S. 5,096,906, y U.S. 5,196,430). Adicionalmente pequeñas moléculas útiles para tratar las condiciones descritas aquí concurrentemente con polipéptidos TNFR2 cristalino incluyen aquellos descritos en la U.S. 5,547,979.

Adicionalmente, se pueden combinar polipéptidos TNFR2 cristalino con un segundo antagonista TNF-alfa, que incluye un anticuerpo contra TNF-alfa o receptores TNF-alfa, un péptido derivado TNF-alfa que actúa como un inhibidor competitivo de TNF-alfa (tal como aquellos descritos en la US. 5,795,859 o U.S. 6,107,273), un TNFR soluble diferente a la proteína Ig de fusión, u otras moléculas que reducen los niveles TNF-alfa endógeno, tales como oligonucleótidos antisentido o ribozimas que inhiben la producción de TNF-alfa o inhibidores del TNF-alfa que convierten enzimas (ver por ejemplo, U.S. 5,594,106), o cualquiera de las moléculas pequeñas o inhibidores de TNF-alfa que se describieron anteriormente, que incluyen pentoxifilina o talidomida o derivados de estos. Talidomida o los derivados de talidomida se pueden administrar concurrentemente con los polipéptidos TNFR2 cristalino para tratar, por ejemplo, desórdenes oncológicos y hematológicos. Ejemplos de tales desórdenes, cualquiera de los cuales se puede tratar con los polipéptidos

.- 000200

TNFR2 cristalino solo, incluyen enfermedad huésped versus injerto, síndromes mielodisplásico, anemia aplásica, crisis vasoclusiva célula falciforme, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia por tricoleucitos, síndrome paraneoplásico de caquexia e hipercalcemia, mieloma múltiple y síndrome POEMS (Polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gamopatía monoclonal y cambios de piel), mielofibrosis/metaplasma mieloide, carcinoma de Kaposi, caquexia asociada con cáncer, amiloidosis, anemia de enfermedad crónica, carcinoma celular escamoso, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), anemia hemolítica autoinmune, y beta talasemia. En una modalidad de la invención, el polipéptido TNFR2 cristalino utilizado en combinación con talidomida es TNFR2:Fc cristalina o etanercept cristalino.

Adicionalmente, la invención objeto suministra métodos para tratar un paciente humano en necesidad de este, el método involucra administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido TNFR2 cristalino y un inhibidor IL-4, como se describe en la U.S. 2001/0021380 A1, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Condiciones efectivamente tratadas mediante una combinación de un polipéptido TNFR2 cristalino y un inhibidor IL-4 incluye asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica,

.. 000201

proteínosis alveolar pulmonar, neuropatía inducida por pleomicina y fibrosis, fibrosis pulmonar inducida por radiación, fibrosis quística, acumulación de colágeno en los pulmones, ARDS; varios desórdenes de la piel, que incluyen pero no están limitados a dermatitis herpetiforme (enfermedad de Duhring), dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria (que incluye urticaria idiopática crónica), y enfermedades formadoras de ampolla autoinmunes, que incluyen pemphigus vulgaris y pemfigoide bulloso; miastenia gravis, sarcoidosis, que incluye sarcoidosis pulmonar, escleroderma, artritis reactiva, síndrome hiper IgE, esclerosis múltiple, y síndrome hipereosinófilo idiopático; reacciones alérgicas a la medicación, y como un adyuvante para inmunoterapia alérgica. En ciertas modalidades, las combinaciones de polipéptidos TNFR2 cristalino e inhibidores IL-4 se administran una o más veces por semana mediante inyección subcutánea o mediante administración pulmonar en aerosol, por ejemplo mediante nebulizador.

Otros tratamientos para las enfermedades descritas aquí incluyen administrar polipéptidos de TNFR2 cristalino concurrentemente con compuestos que bloquean la unión de RANK y ligando RANK, tal como anticuerpos antagonísticos contra RANK o ligando RANK, osteoprotegerina o formas solubles de RANK, que incluyen RANK:Fc, y formas solubles de ligando RANK

que no activan RANK. En una modalidad de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente al RANKK humano se administran concurrentemente con polipéptido TNFR2 cristalino, tal como TNFR2:Fc cristalino. Las formas solubles de RANK adecuadas para estas combinaciones se describen, por ejemplo, en U.S. 6,017,729. La administración concurrente de los polipéptidos de TNFR2 cristalino junto con los RANK:Fc o osteoprotegerina es útil para evitar la destrucción del hueso en varias configuraciones que incluyen pero no está limitada a osteoporosis, mieloma múltiple u otras modalidades que originan degeneración del hueso, o terapia antitumor que ayuda a la prevención de metástasis al hueso, o destrucción de hueso asociado con residuos por usos de prótesis o con ediodontitis. Los tumores que son tratables con una combinación de un polipéptido de TNFR2 cristalino y un inhibidor RANK incluyen cáncer de seno, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de hueso, carcinoma celular escamoso, cáncer de cuello y cabeza, cáncer renal, cáncer de próstata, y cánceres asociados con hipercalcemia.

Usos Adicionales

La transfección de linfocitos sin vectores virales puede conducir a apoptósisis de la célula objetivo a través de una trayectoria mediada por CD95 y TNF-alfa (ver, por ejemplo,

000203

Ebert et al., *Citokines, Cell & Mol Ther* 5:165-73 (1999). Los polipéptidos de TNFR2 cristalinos, tales como TNFR2:Fc, se pueden utilizar solo o en combinación con un inhibidor CD95, tal como un anticuerpo CD95, para inhibir esta apoptosis. Este tratamiento aumentará la transferencia de gen a los linfocitos cuando no se utilizan vectores virales, particularmente cuando se utiliza métodos de transferencia de gen mediada por receptor o mediada por liposoma. Tales tratamientos mejorarán la incorporación del gen exógeno dentro de las células objetivo.

Adicionalmente, las presentes composiciones también se pueden utilizar para fabricar uno o más medicamentos para tratamiento o la mejora de las condiciones que pretende tratar el polipéptido de TNFR2 cristalino.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para mayor ilustración de la invención, pero no se constituyen como limitantes del alcance de esta.

Ejemplo 1

Método para la Cristalización de ENBREL® (etanercept)

El polipéptido etanercept consiste de una porción de dominio de factor de necrosis de tumor humano receptor 2 (TNFR p75)

fusionado a una porción de inmunoglobulina humano G1 (IgG1), como se describió anteriormente. El polipéptido etanercept se preparó al expresar la construcción de ADN que codifica etanercept en células huésped de mamífero y luego simplificó para homogeneidad sustancial. Por los siguientes experimentos de cristalización el polipéptido etanercept se suspendió en un amortiguador de fosfato.

La cristalización de etanercept se alcanzó al utilizar una selección de cristalización (PEG/Lic. Gris Screen; Hampton Research, Aliso Viejo, CA), la cual emplea un método para cristalización de moléculas conocido como difusión de vapor de "gota colgante". Una gota compuesta de una mezcla de la muestra de polipéptido y el reactivo de cristalización (el "amortiguador de cristalización" o el "licor madre") se deposita en el lado inferior de una tira sialanizada y luego la gota en la tira se sella con grasa y se coloca sobre una bandeja VDX de 24 pozos que origina un vapor de equilibrio con un reservorio líquido de reactivo. Para alcanzar el equilibrio, el vapor de agua intercambia entre la gota y un mililitro de una solución de reservorio en el pozo de la bandeja. En razón a que el agua deja la gota, la muestra de polipéptido experimenta un incremento en la concentración relativa que puede conducir eventualmente a supersaturación. Esta es la concentración incrementada de la muestra de

polipéptido que se requiere para que tenga lugar la cristalización. Típicamente la gota contiene una concentración inferior de reactivo que el reservorio, y típicamente, la gota contiene la mitad de la concentración del reactivo en el reservorio, ya que volúmenes iguales de muestra y reactivos se mezclan para formar la gota. En esos experimentos, la concentración de polipéptido inicial en la gota era usualmente de 25.48 mg/mL o 50.96 mg/mL, pero también se observó cristalización en concentraciones de polipéptido etanercept de aproximadamente 6 mg/mL, y se pueden obtener en concentraciones mayores tales como 100 mg/mL, o en concentraciones menores de polipéptido tales como aproximadamente 3 mg/mL, pero a concentraciones inferiores, se puede requerir incubación para largos periodos para crecimiento de cristal, dependiendo del tamaño inicial de la gota.

La selección de cristalización se estableció en bandejas de cultivo de tejido de polipropileno VDX de 24 pozos. Cada posición en la bandeja VDX contiene 1 mL de reservorio reactivo, con el reservorio de reactivo en cada pozo que difiere en la composición de aquel en los otros pozos, para establecer un ensayo de condiciones de amortiguador de cristalización diferentes. Un microlitro de solución de polipéptido en cada concentración de polipéptido se agregó a

000206

1 microlitro de solución de reservorio para formar las gotas. Las bandejas se incubaron a 5 ± 3 grados C o a temperatura ambiente (20 ± 3 grados C). Los cristales aparecieron en aproximadamente a 48 horas en algunos de los pozos incubados a temperatura ambiente, y se continuó el crecimiento durante los días posteriores.

En las selecciones iniciales se obtuvo cristales en las siguientes condiciones, utilizando una concentración etanercept de 25.48 mg/mL o una concentración de 50.96 mg/mL:

1. 1.0M de cloruro de litio, 0.1M HEPES ph 7.0; 30% polietilenglicol 6000.
2. 1.0M de cloruro de litio, 0.1M Tris-HCL ph 8.0; 30% polietilenglicol 6000.
3. 1.0M de cloruro de litio, 0.1M Bicina pH 9.0; 30% polietilenglicol 6000.
4. 0.2M de sulfato de litio, 0.1M Tris-HCl pH 8.5, 30% de polietilenglicol 4000.
5. 0.2M de sulfato de litio, 0.1M Tris-HCl pH 8.5, 25% de polietilenglicol 3350.

000207

6. 0.5M de sulfato de litio, 0.1M Tris-HCl pH 8.5.

Los cristales de etanercept formados bajo las tres primeras condiciones anteriores formaron barras o grupos de barras de aproximadamente 0.1-0.2 mm de longitud, y se acompañaron a menudo por un precipitante amorfo. Los cristales de etanercept formados en las condiciones de sulfato de litio formaron barras de aproximadamente 0.1-0.2 mm de longitud, y se produjeron sin verse el precipitado amorfo en las condiciones de cloruro de litio. Algunos de los cristales de etanercept se ensayaron por difracción de rayos X y no mostraron un patrón de difracción similar a sal, un resultado consistente con los cristales tales que contienen el material de polipéptido. Algunos de los cristales de etanercept se solubilizaron y su contenido de polipéptido fue parcialmente subsecuenciado por siete ciclos de degradación Edman automatizada; una secuencia de aminoácido parcial de 3-4 pmol se obtuvo a partir de estos cristales y se confirmó que cazan la porción N-terminal de la secuencia etanercept (LPAQVAF; ver aminoácidos 1 a 7 de la ID de Sec. No.:4). La figura 1 es una fotografía de cristales de etanercept formados a partir de una solución de polipéptidos que contiene 50.96 mg de etanercept por mililitro, con un amortiguador reservorio de cristalización de 0.1 M de HEPES pH 7.0, 30% PEG 6000, 0.7M

000208

de cloruro de litio; después de siete días a temperatura ambiente los cristales se cosecharon manualmente, se lavaron extensivamente en el amortiguador del reservorio anterior, y se tomó una fotografía. Los cristales de este grupo se presentaron para el análisis de secuencia de aminoácido N-terminal descrito anteriormente. Otra condición de cristalización-sulfato de litio 1M, 0.1M Tris HCl pH 8.5, cloruro de níquel 0.01M-cristales producidos; sin embargo, el contenido de polipéptido de estos cristales no se confirmó y por lo tanto de acuerdo con esta combinación particular de condiciones se piensa que se han formado los cristales de sal.

Basados en estos resultados, cada uno de los tres parámetros de las tres primeras condiciones anteriores (concentración Lic., PH, y (PEG) 6000 polietilenglicol expresado como % (peso/volumen)) se varió en experimentos adicionales, que resultan en formación de cristales en cada gota en las bandejas experimentales adicionales. Las condiciones de cloruro de litio entre 0.7M y 1.2M, PEG 6000 entre 22% y 32%, y valores 0.1M HEPES entre pH 6.8 y 7.3 todos resultaron en cristalización exitosa en aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente, en concentraciones de etanercept de 25,48 y 50,96 mg/mL. Experimentos adicionales expandieron el rango de condiciones de cristalización exitosa para incluir

000209

0.2M a 1.2M Lic., y 16% a 32% PEG 6000, aunque la cristalización de etanercept no puede ocurrir en cada combinación de condiciones que incluye 0.2M Lic., y/o cristales de etanercept que pueden ser mayores para formar cuando se utiliza 0.2M de Lic. Por lo tanto, todas las combinaciones de las siguientes condiciones-concentraciones de cloruro de litio entre 0.3M y 1.2M, concentraciones de PEG 6000 entre 16% y 32%, y valores de pH HEPES 0.1M entre pH 6.8 y 7.3 - se consideran son condiciones adecuadas para cristalización de etanercept; adicionalmente, las condiciones que contienen entre 0.2M y 0.5M de sulfato de litio, 0.1M Tris-HCl a pH aproximadamente de 8.5, y opcionalmente incluyen hasta 30% de PEG en el tamaño varía de PEG 3350-PEG 4000, se considera son condiciones adecuadas para cristalización de etanercept.

Ejemplo 2

Métodos Adicionales para la Cristalización de ENBREL®

(etanercept)

El método de "gotas colgantes" de cristalización, como se describió en el ejemplo anterior, se utiliza para preparar cristales adicionales de etanercept. El etanercept se reconstituyó a partir de ENBREL® disponible comercialmente liofilizado en polvo como instrucciones del producto; un

.. 000210

frasco de polvo liofilizado de ENBREL® contiene 25 mg de etanercept, 40 mg de manitol, 10 mg de sucrosa, y 1.2 mg de trometamina, que se reconstituye con 1mL de agua Bacteriostática Estéril Para Inyección, USP (que contiene 0.9% de bencil alcohol). La solución etanercept reconstituida se dializó en agua al utilizar un cassette de diálisis de corte de peso molecular 10,000, y luego se concentró a 100 mg/mL al utilizar un filtro centrífugo de corte de peso molecular 10,000. Cada pozo de cristalización contenía 1.0 mL de un reactivo de cristalización particular, como se lista adelante, en el reservorio. Las gotas se hicieron al agregar 1 microlitro de 100 mg/mL de solución de etanercept a 1 microlitro de aquel reactivo de cristalización. Los cristales crecieron a temperatura ambiente (aproximadamente 22 grados C); los cristales similares a aguja de etanercept de cerca de 100 micrómetros en longitud formados en todos los reactivos de cristalización se listan adelante, en algunos casos tan poco como dos días, y en otros casos durante un periodo de dos o cuatro semanas.

Condición de sal	Condición de amortiguador	Condición 2-metil-2,4-pentanediol (MPD) :
0.09M fosfato de amonio	0.10M acetato de sodio, pH 4.5	40.28% MPD
0.10M fosfato de	0.10M acetato de	37.82% MPD

000211

amonio		sodio, pH 4.0	
0.10M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 5.0	35.11% MPD
0.08M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 5.0	41.83% MPD
0.12M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 4.0	31.30% MPD
0.15M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 5.0	43.82% MPD
0.11M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 4.0	30.55% MPD
0.04M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 5.0	45.75% MPD
0.19M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 4.0	30.78% MPD
0.14M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 4.0	37.13% MPD
0.16M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 4.0	31.27% MPD
0.23M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 4.0	41.87% MPD
0.18M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 4.5	34.10% MPD%
0.09M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 4.0	46.00% MPD
0.09M fosfato de amonio		0.10M acetato de sodio, pH 4.5	46.01% MPD
0.09M fosfato de amonio		0.10M Hepes, pH 7.5	33.92% MPD
0.20M fosfato de amonio		0.10M Tris, pH 8.5	50.0% MPD

000212

Los experimentos de cristalización adicional, cristales similares a aguja de etanercept cerca de 100 micrómetros en longitud formados durante un periodo de dos a cuatro semanas de acuerdo con las siguientes condiciones de cristalización:

Condición de sal	Condición amortiguadora	Condición PEG	Temperatura:
1.0M hidrogen fosfato diamonio; 0.2M Cloruro de sodio	0.1M imidazol, pH 8.0	—	Aproximadamente 22 grados C
1.0M hidrogen fosfato diamonio	0.1M imidazol, pH 8.0	—	Aproximadamente 22 grados C
0.2M cloruro de sodio	0.1M CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanesulfónico), pH 10.5	20% PEG 8000	2-8 grados C

Ejemplo 3

Expansión Adicional de Condiciones de Cristalización

Los métodos de cristalización de difusión de vapor, tal como el método "gota colgante" descrito para la cristalización de etanercept en el ejemplo 1 anterior, se pueden variar con el fin de alcanzar la cristalización de polipéptidos tales como polipéptidos TNFR2. Por ejemplo, otros volúmenes de muestra de polipéptido relacionada con reactivos se pueden mezclar para variar la diferencia en la concentración de reactivo

.. 000213

entre la gota y el reservorio, y también la concentración de polipéptido inicial en la gota. Mezclar una parte del reactivo a nueve partes de muestra de polipéptido producirá una gota con una concentración inicial de reactivo que es 0.1 veces aquella de la concentración del reactivo del reservorio. En ciertas modalidades de la invención, la concentración inicial de reactivo de cristalización en la gota es aproximadamente 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.7, 0.8, 0.85, 0.9, o 0.95 veces a aquella de la concentración del reactivo de cristalización en el reservorio. La concentración de polipéptido inicial en la gota puede ser al menos tan baja como aproximadamente 6 mg/mL y al menos tan alta como 100 mg/mL y posiblemente tan alta como 120 mg/mL; las concentraciones inferiores de polipéptido tales como 3 mg/mL pueden formar cristales, pero pueden requerir mayores tiempos de incubación antes que se puedan detectar los cristales.

La expansión adicional de las condiciones de cristalización pueden producir condiciones adicionales que son apropiadas para obtener cristales de etanercept u otros polipéptidos TNFR2, como se describe adelante. Por ejemplo, se pueden hacer combinaciones de una condición de sal, una condición de amortiguador de pH, una condición PEG opcional, y una condición de cofactor opcional, en donde cada condición se

000214

selecciona a partir del grupo que corresponde de las condiciones descritas adelante.

	Rangos de valor; Mínimo (seleccionado de adelante) a Máximo (seleccionado de adelante)		
	Valores mínimos:	Valores Máximos:	Ejemplos de valores específicos:
Condiciones de sal			
Cloruro de litio	0.05M o 0.1M	1.5M, 2.0M, o 5.0M	0.5M, 0.7M, 1.0M, 1.2M
Sulfato de litio	0.05M o 0.1M	1.0M, 20M, o 5.0M	0.2M, 0.35M, 0.5M
Cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, citrato de potasio, acetato de amonio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, o sulfato de sodio	0.01M 0.025M 0.05M, 0.1M, o 0.5M	1.0M, 1.5M, 20M, 2.5M, o 5.0M	0.1M, 0.2M, 0.35M, 0.5M, 0.75M, 1.0M, 1.5M
Hidrogen fosfato diamonio	0.1M, 0.5M	1.5M, 2.0M	1.0M
Condiciones de amortiguador pH:			
0.05M, 0.1M, o 0.15M HEPES	pH 4.0, 5.0, o 6.0	pH 8.0, 8.5, o 9.0	pH 6.5, 6.75, 6.9, 7.0, 7.25, 7.5, 7.75
0.05, 0.1M, o 0.15M Tris-HCl	pH 5.0, 6.0, o 7.0		pH 7.25, 7.5, 7.75, 8.0, 8.25, 8.5, 8.75
0.05M, 0.1M, o 0.15M Bicina	pH 5.0, 6.0, o 7.0		pH 8.0, 8.25, 8.5, 8.75, 9.0, 9.25, 9.5
0.05M, 0.1M o 0.15M acetato de sodio	pH 4.0	pH 10.0, 10.5, o 11.0	pH 4.0, 4.5, 5.0
0.05M, 0.1M, 0.15M	pH 7.5	pH 8.5	pH 8.0

imidazol			
----------	--	--	--

Ejemplo 4

Propiedades de ensayo de los Polipéptidos Cristalinos

Después de que se forman los cristales de polipéptido, ellos se pueden someter a varios análisis para confirmar su contenido de polipéptido para examinar adicionalmente su estructura física. Por ejemplo, si los cristales individuales necesarios se pueden remover de la solución de cristalización y lavarlos con solventes acuosos u orgánicos o aditivos, luego secados (por ejemplo, mediante secado, por aire al pasar una corriente de gas inerte sobre el cristal, mediante liofilización, o al vacío). Los cristales se pueden aislar, remover de los cristales que crecen en gota, y luego montarlos para difracción de rayos X.

Como otro ejemplo, los cristales de polipéptido se pueden remover de la solución de cristalización y lavar o enjuagar, o la mayoría de la solución de cristalización se puede remover de los cristales y reemplazarlos con una solución diferente. De esta forma, la sal particular que se utiliza en el procedimiento de cristalización se puede reemplazar en la red de cristal con una sal diferente. En una modalidad de la dimensión, los polipéptidos TNFR2 cristalizados tales como

.. 000216

etanercept cristalino se separan del amortiguador de cristalización y se colocan en una solución que contienen una sal de sodio, potasio, o magnesio (por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, citrato de potasio, o sulfato de magnesio). Por difracción de rayos X, la solución de reemplazo puede contener átomos pesados útiles en la determinación de las coordenadas atómicas del polipéptido cristalizado. Como una modalidad adicional, los polipéptidos TNFR2 se pueden cocrystalizar con su ligando, por ejemplo el etanercept se puede cocrystalizar con TNF-alfa, para la determinación de la estructura detallada de la interacción TNFR-ligando.

En un ejemplo adicional, los cristales de polipéptido se pueden remover de la solución de cristalización y solubilizar en un amortiguador apropiado para ensayo adicional, tal como un amortiguador que contiene SDS para análisis del polipéptido que ha sido cristalizado mediante electroforesis de gel. Los métodos para análisis de proteína mediante electroforesis de gel son bien conocidos e incluyen teñido el gel con plata o tinte azul, y comparar la migración electroforética del polipéptido que ha sido cristalizado con la migración de los marcadores de polipéptido de peso molecular conocido. En otro método, el polipéptido se

visualiza en el gel mediante el uso de un anticuerpo etiquetado que se une específicamente al polipéptido. Los polipéptidos que han sido cristalizados también se pueden solubilizar en amortiguadores apropiados para el secuenciamiento de aminoácidos por degradación Edman, para espectrometría de masa, para dispersión espectrográfica, refracción, difracción, o estudios de absorción, o para etiquetado del polipéptido mediante la adhesión de una molécula etiquetada al polipéptido.

Ejemplo 5

Ensayo de Contenido de Proteína de Cristal de ENBRELO®

(etanercept)

El método de "gota colgante" de cristalización, como se describe en el Ejemplo 1 anterior, se utiliza para preparar cristales adicionales de etanercept. Cada pozo contiene 100 microlitros del reactivo de cristalización en el reservorio; el reactivo de cristalización en este experimento era de 0.2M de acetato de amonio, 0.1M Tris pH 8.5, y 45% de 2-metil-2,4-pentanediol (MPD). El etanercept se colocó dentro de una solución que contiene 25mM de fosfato de sodio de pH 6.3, 100 mM de NaCl, luego se concentró a 29-30 mg/mL, por ejemplo, a 29.6 mg/mL. Se hicieron las gotas al agregar 1 microlitro de esta solución de 29 mg/mL de etanercept a 1 microlitro del

000218

reactivo de cristalización, para concentración de etanercept final en la gota de aproximadamente 14.5-15 mg/mL. La concentración final de etanercept en la droga se encontró que es un factor importante al alcanzar la cristalización de acuerdo con estas condiciones de cristalización particulares, una concentración de etanercept final de aproximadamente 15 mg/mL es efectivo para cristalización en experimentos repetidos, mientras que las concentraciones finales de menos de 10 mg/mL o mayores de 25 mg/mL no fueron efectivas. Las gotas se les permitió intercambio de vapor con reactivo en el reservorio durante aproximadamente uno a tres semanas a temperatura ambiente (20 ± 3 grados C). Los cristales, usualmente de dos a cuatro nucleaciones independientes por gota, formadas y parecidas como multiramas o estructuras dendríticas con numerosas proyecciones o ramas que salen de la estructura principal. Las dimensiones generales de cada rama intacta era de aproximadamente de 50 micrómetros de longitud del centro de nucleación, aproximadamente 30 micrómetros de ancho, y aproximadamente 10 micrómetros de espesor o profundidad. Una de tales ramas se removió del cristal con un aro de nylon, se lavó con el reactivo de cristalización anterior y se lavó en tres series, se solubilizó en amortiguador Laemmli 4XSDS, y luego se colocó en el pozo de un gel de poliacrilamida SDS y se sometió a electrofóresis. Luego de la electrofóresis el gel fue teñido

000219

con plata, y hay una banda teñida de plata claramente visible en la senda que corre de la proteína cristalizada que emigra al mismo alcance como la proteína de la preparación de etanercept utilizada para producir el cristal. Este ensayo de electrofóresis de gel de poliacrilamida SD se repitió al utilizar otras ramas de cristales producidos en los mismos experimentos, y el teñido de una banda de material cristalino solubilizado, con la misma migración electroforética como el etanercept, también se alcanzó a utilizar teñido azul Coomassie. Por lo tanto, los cristales que se formaron de la solución contienen material que aparentemente es etanercept, en razón a que este emigra en un gel de poliacrilamida SDS y produce una banda de proteína en el gel en la misma forma que lo hace una muestra conocida de proteína etanercept.

Ejemplo 6

Ensayo de Actividad Biológica de Polipéptidos Cristalizados

Como se describió en el ejemplo anterior, los cristales de polipéptido se pueden recubrir a partir de la solución de cristalización, colocada opcionalmente en una solución diferente, lavada, y/o secada para remover el amortiguador de cristalización, y luego solubilizada en una solución apropiada para ensayos adicionales. Las actividades biológicas de los polipéptidos TNFR2 se pueden ensayar al

.. 000220

utilizar cualquiera de un número de ensayos, por ejemplo, ensayos de unión para determinar la habilidad del TNFR2 previamente cristalizado (es decir polipéptido TNFR2 reconstituido) para unirse a su ligando. Los siguientes ejemplos ilustran ensayos para medir la actividad biológica de aquellos polipéptidos TNFR2 que se unen al TNF-alfa, tal como etanercept (ver por ejemplo, Mohler et al., 1993, J Immunol 151: 1548-1561), pero aquellos expertos en la técnica reconocerán que tales ensayos se pueden modificar para uso en la medición de las actividades biológicas de otros polipéptidos TNFR2.

Ensayo de Competición de Unión

El TNF-alfa humano etiquetado tal como [¹²⁵I] TNF-alfa a 0.5 nM se incuba en medio de unión (RPMI 1640, 2.5% BSA, 50mM HEPES pH 7.4, 0.4% NaN₃) durante dos horas a 4 grados C con agentes de unión competitiva diluida serialmente (por ejemplo etanercept reconstituido de forma cristalina, u otro polipéptido TNFR2 de unión TNF-alfa que ha sido reconstituido de la forma cristalina, o TNF-alfa humano no etiquetado, o etanercept no cristalizado como un control) y células 2x10⁶ U937. Alícuotas duplicadas se remueven posteriormente, se centrifuga a través de una mezcla de aceite eftalato para separar ligando unido y libre, y la radioactividad [¹²⁵I] TNF-

alfa) se mide utilizando un contador gama. Valores de unión no específicos se determinan mediante la inclusión de un exceso molar 200X TNF-alfa no etiquetado y se sustrajeron del total de datos de unión para producir valores de unión específico (ver por ejemplo Park et al., 1990, J Exp Med 171: 1073-1089).

Rescate de la Mortalidad Inducida por LPS

La inyección de una dosis letal de LPS (lipopolisacárido) eleva los niveles de TNF-alfa en suero en ratones, que origina la mortalidad si una cantidad suficiente de un agente que neutraliza los efectos de TNF-alfa tampoco se administra (ver por ejemplo Mohler et al., 1993, J Immunol 151: 1548-1561). El LPS, tal como LPS bacterial derivado de E. coli, se resuspende en 10 mg/mL en solución salina estéril y se almacena a -20 grados C en alícuotas pequeñas. El LPS se diluye a la concentración apropiada y se sonica durante un minuto antes de inyección. Ratones tales como ratones hembras BALB/c (18 a 20g) se inyectan intravenosamente con una dosis LD60 a LD100 de LPS (300 a 400 microgramos) en 0.2 mL de solución salina. Se inyecta el LPS ya sea solo o en conjunto con etanercept reconstituido a partir de la forma cristalina, u otro polipéptido TNFR2 de unión TNF-alfa que ha sido reconstituido a partir de la forma cristalina, o proteínas de

control tales como etanercept no cristalizado o IgG humano. Se monitorea la supervivencia durante al menos 5 días. La presencia del polipéptido TNFR2 de unión TNF-alfa reconstituido activo se indica mediante el incremento de supervivencia de ratones inyectados con LPS, cuando se administra una cantidad suficiente del polipéptido TNFR2 de unión TNF-alfa reconstituido.

La presente invención se ha descrito en términos de modalidades particulares halladas o propuestas para comprender ciertas formas para la práctica de la invención. Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que, en claridad de la presente descripción, se pueden hacer numerosas modificaciones y cambios en las modalidades particulares ejemplificadas sin apartarse del alcance propuesto de la invención.

SECUENCIAS PRESENTADAS EN LA LISTA DE SECUENCIAS

ID de SEC No.	Tipo	Descripción
ID de SEC No: 1	Aminoácido	Receptor 2 de factor de necrosis de tumor humano; (TNFR2, p75, CD120b, TNFRSF1S); No. de acceso de base de datos Swiss-Prot P20333
ID de SEC No: 2	Aminoácido	Región constante de cadena

000223

		gama-1 inmunoglobulina humana (IgG1; No. de acceso de base de datos Swiss-Prot P01857)
ID de SEC No: 3	Aminoácido	Variante de región constante de cadena gama-1 Inmunoglobulina humana (ID de SEC No.:2 con Asp239->Glu; Leu241->Met)
ID de SEC No: 4	Aminoácido	Etanercept

000224

REIVINDICACIONES**LO QUE SE REIVINDICA ES:**

1. Un cristal de etanercept.
2. Un cristal de etanercept como se describe en la reivindicación 1, en donde el cristal está en la forma de una barra.
3. Un cristal de etanercept como se describe en la reivindicación 1, en donde el cristal tiene una longitud máxima de entre 0.05 milímetros y 1.5 milímetros.
4. Un cristal de etanercept como se describe en la reivindicación 1, en donde el cristal tiene una longitud máxima de entre 0.05 milímetros y 0.3 milímetros.
5. Un cristal de etanercept como se describe en la reivindicación 1, en donde el cristal comprende una sal seleccionada del grupo que consiste de acetato de amonio, fosfato de amonio, sulfato de amonio, hidrogen fosfato di-amonio, cloruro de litio, sulfato

000225

de litio, sulfato de magnesio, cloruro de potasio, citrato de potasio, fosfato de potasio, acetato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio, y sulfato de sodio.

6. Un cristal de etanercept como se describe en la reivindicación 1, en donde el cristal comprende una sal seleccionada del grupo que consiste de acetato de amonio, fosfato de amonio, hidrogenfosfato diamonio, y cloruro de sodio.
7. Un método para fabricar un cristal de etanercept, en donde el método comprende combinar una solución de polipéptido de etanercept con un amortiguador de cristalización que comprende una sal.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la combinación se coloca en equilibrio de vapor con un reservorio de amortiguador de cristalización.
9. El método de la reivindicación 7, en donde el amortiguador de cristalización tiene un pH entre 4.0 y 10.5.

000226

10. El método de la reivindicación 7, en donde la sal se selecciona a partir del grupo que consiste de acetato de amonio, fosfato de amonio, sulfato de amonio, hidrogenfosfato diamonio, cloruro de litio, sulfato de litio, sulfato de magnesio, cloruro de potasio, citrato de potasio, fosfato de potasio, acetato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio, y sulfato de sodio.
11. El método de la reivindicación 7, en donde la concentración de sal en el amortiguador de cristalización está entre 0.04M y 1.2M.
12. El método de la reivindicación 7, en donde el amortiguador de cristalización incluye además 2-metil-2,4-pentanediol (MPD) o polietilenglicol (PEG).
13. El método de la reivindicación 7, que comprende además remover una porción del amortiguador de cristalización después de que se han formado los cristales.
14. El método de la reivindicación 13, en donde la porción del amortiguador de cristalización se remueve mediante centrifugación.

.. 000227

15. El método de la reivindicación 13, en donde los cristales se colocan en una solución que contiene un aditivo orgánico.
16. El método de la reivindicación 13, que comprende además la adición de un excipiente.
17. El método de la reivindicación 16 en donde el excipiente se selecciona a partir del grupo que consiste de sucrosa trehalosa, o sorbitol.
18. El método de la reivindicación 15 en donde el aditivo orgánico es etanol o isopropanol.
19. El método de la reivindicación 7, que comprende además secar los cristales que se han formado.
20. El método de la reivindicación 19 en donde los cristales se secan mediante exposición al aire, o mediante exposición a un vacío, o mediante exposición a gas nitrógeno.
21. Un cristal de etanercept producido mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 20.

000228

22. Una composición que comprende etanercept en forma cristalina.
23. Una composición producida mediante al reconstituir etanercept cristalino.
24. El uso de un cristal de etanercept como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 o una composición como en cualquiera de las reivindicaciones 22-23 en la preparación de un medicamento.
25. El uso de la reivindicación 24 en donde el medicamento es para tratar una condición caracterizada por niveles de TNF-alfa excesivos.
26. El uso de la reivindicación 25 en donde el medicamento reduce los niveles de TNF-alfa en el suero o tejidos del sujeto.
27. El uso de la reivindicación 25 en donde la condición es artritis reumatoide, artritis soriática, soriasis, o artritis anquilosante.

000229

Figura 1



LISTADO DE SECUENCIA

000230

<110> AMGEN, Inc.

OSSLUND, Timothy D.

CLOGSTON, Christi

CRAMPTON, Shon

BASS, Randal

<120> CRYSTALLINE POLYPEPTIDES

<130> A-859

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 461

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

000231

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240

000232

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
 260 265 270

Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
 275 280 285

Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
 290 295 300

Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
 305 310 315 320

Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
 325 330 335

Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
 340 345 350

Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
 355 360 365

Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
 370 375 380

Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
 385 390 395 400

Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
405 410 415

000233

Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
420 425 430

Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
435 440 445

Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
450 455 460

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

000234

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

000235

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35

40

45

000236

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

000237

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 4

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fusion polypeptide

<400> 4

000238

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

000239

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

000249

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference A-859 (WO)	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2004/024738	International filing date (day/month/year) 29/07/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 01/08/2003
Applicant AMGEN INC.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the International search was carried out on the basis of the International application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



The International search was carried out on the basis of a translation of the International application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

CRYSTALLINE TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR 2 POLYPEPTIDES

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this International search report, submit comments to this Authority.

6. With regards to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1/1



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/715 A61K9/14 A61K9/16

000243

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCALLON BERNIE ET AL: "Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists" JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 301, no. 2, May 2002 (2002-05), pages 418-426, XP002307181 ISSN: 0022-3565 the whole document	1-27
Y	JEN ANNA ET AL: "Diamonds in the rough: Protein crystals from a formulation perspective" PHARMACEUTICAL RESEARCH (NEW YORK), vol. 18, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 1483-1488, XP002307178 ISSN: 0724-8741 the whole document	1-27
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 2004

Date of mailing of the international search report

07/01/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Wimmer, G

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANG MARK X ET AL: "Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 100, no. 12, 10 June 2003 (2003-06-10), pages 6934-6939, XP002307180 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-27
A	PARK YOUNG CHUL ET AL: "Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2" NATURE (LONDON), vol. 398, no. 6727, 8 April 1999 (1999-04-08), pages 533-538, XP002307179 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-27
T	GOFFE BEN ET AL: "Etanercept: An overview." JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY. AUG 2003, vol. 49, no. 2 Suppl, August 2003 (2003-08), pages S105-S111, XP009040453 ISSN: 0190-9622 the whole document	1-27

To:

PCT

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing

(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference

see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US2004/024738

International filing date (day/month/year)

29.07.2004

Priority date (day/month/year)

01.08.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

C07K14/715, A61K9/14, A61K9/16

Applicant

AMGEN INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Wimmer, G

Telephone No. +49 89 2399-7347



000246

Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ in written format
 - ☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in computer readable form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
- 3 ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

000247

Box No. II Priority

1. ☐ The following document has not been furnished:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(a)).
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(b)).
- Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. ☒ It has not been possible to consider the validity of the priority claim because a copy of the priority document was not available to the ISA at the time that the search was conducted (Rule 17.1). This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.
4. Additional observations, if necessary:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-21, 23-27
	No: Claims	22
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-27
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-27
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re item V.

The following documents are referred to in this communication:

- D1 : JEN ANNA ET AL: "Diamonds in the rough: Protein crystals from a formulation perspective" PHARMACEUTICAL RESEARCH (NEW YORK), vol. 18, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 1483-1488, XP002307178 ISSN: 0724-8741
- D2 : YANG MARK X ET AL: "Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 100, no. 12, 10 June 2003 (2003-06-10), pages 6934-6939, XP002307180 ISSN: 0027-8424

1. A given protein solution does (in the general case) not allow to determine *how* this solution was created. The composition of claim 23 therein cannot be distinguished from any other solution containing etanercept; claim 23 therefore lacks novelty.
2. The prior art does not disclose a crystalline form of etanercept. Subject-matter of claims 1-22 and 24-27 is therefore novel.
3. Crystallization of a given polypeptide is a routine measure in the field for several purposes. First, crystallization is routinely employed in methods of structural analysis; since such analysis is a general option in the investigation of a protein, the skilled person would, in the general case, routinely envision to crystallize any protein of interest.
Moreover, crystallized proteins are used as pharmaceuticals, since the crystallized form confers advantages with respect to e.g. stability, and better control over bioavailability (see e.g. D2). The skilled person would therefore in general also envision crystallization of therapeutic proteins.

In the present case, etanercept (commercially available as Enbrel) was known to be one of the two major TNF antagonists available on the market at the priority date. From this alone, the skilled person would envision to provide the drug in other forms, such as in crystallized form. He would even be particularly motivated to do so, since also the other TNF antagonist, Infliximab, had been crystallized, and the protein crystals suggested as pharmaceuticals.

There was therefore a strong motivation for the production and the pharmaceutical application of crystals of etanercept.

4. Although etanercept and infliximab are only partially related in terms of their composition (see D1), there was no indication in the art that crystallization of etanercept would not work, as the protein is soluble and proteins of similar size (such as infliximab) had been successfully crystallized before. The skilled person would therefore try to crystallize etanercept by methods known in the art.
5. Although a variety of parameters may have to be adjusted for successful crystallization of a given protein or protein complex, and while this may require considerable effort and time, standard procedures for optimization of crystallization conditions are known in the field, and also commercial kits for this purpose are available. Moreover, as robotic procedures allow for automated adjustment and optimization of crystal growth conditions on a very large scale, crystallization has become a routine technique for most proteins in recent years (see e.g. D2). In the general case, an inventive activity is acknowledged for the crystallization of a given protein or protein complex only if the method per se is novel and inventive, and if successful crystallization can not be achieved by standard means.

In the present case, crystallization was achieved by such standard methods (e.g. by using a commercially available crystallization kit); the creation of crystals of etanercept therefore did not involve inventive activity.

As stated above, it was also obvious to envision the use of such crystals as pharmaceuticals.

Subject-matter of claims 1-27 therefore does not involve inventive activity.

254

280

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación: 06063419 00000000 Folios: 253
Fecha (RNO): 2006-02-01 16:27:46
Trámite : 411 PCF-PATENT 378 FASE NULI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2606 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

**REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL
TRAMITE**

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (✓) MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	(✓)	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	(✓)	()
-Descripción de la invención.	(✓)	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	(✓)	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	(✓)	()
COMPLETA (✓) INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Fecha:


Bogotá, febrero 1 de 2006

255
251

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDÓÑEZ ALVARO

REFERENCIA	Radicación No.	6 9419
	Solicitud internacional	US2004/024738
	Fecha inicio fase nacional	01/03/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3160

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA GONZÁLEZ DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 13 MAR 2006 jramos