



CSA128021



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

10-61141

21. EXPEDIENTE No.

PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POR CROMATOGRFIA DE
INTERCAMBIO CATIONICO

54. TITULO

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

GENENTECH, INC.

DOMICILIO

SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

JUAN PAOLO CADENA SARMENTO

22. BOGOTÁ, D.C.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061141-00000-0000

radicación

Fecha: 2010-05-21 16:43:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE

Nombre: GENENTECH, INC.

Dirección: 1 DNA Way South San Francisco,
CA 94080, US.Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América.Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Calle 70A #4 – 41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura
de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder). _____

4

INVENTOR (ES)
(72)Nombre: Benedicte Andree LEBRETON, Deborah Ann O'CONNOR, Aurelia
SAFTA, Mandakini SHARMA.

Dirección: 1880 Vallejo Street #3 San Francisco, California 94123, US; 1641
Cedar Street San Carlos, California 94070, US; 1655 North California Boulevard
#453 Walnut Creek, California 94596, US; 563 Montego Terrace Sunnyvale,
California 94089, US (respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2008/081516

Fecha

29.10.2008

Publicación Internacional No

WO 2009/058812 A1

Fecha

07.05.2009

6 Título (54):

PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO
CATIÓNICO C 07K 16/06, 1/18, 16/28

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

30.10.2007

60/983,825

SI ☒NO ☐

9 Comprobante de pago No.

10-26.150; 10-29.222

Fecha 18-05-2010

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

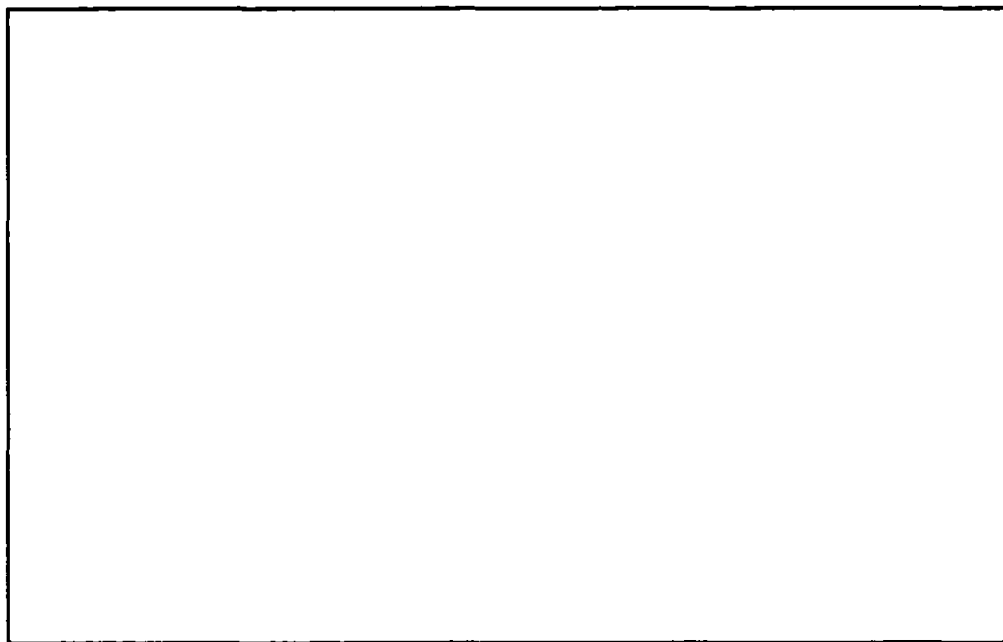
2

10

ANEXOS

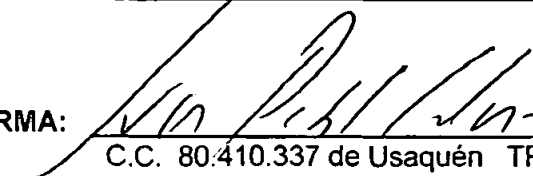
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 554.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. **Fotocopia autenticada.**
- ☒ 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 de 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 12x12.
- ☐ 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: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales.
\$ 260.000 (10*\$26.000)

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA: 
C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

1138223

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 26,150
FECHA : ABRIL 7 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061141- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:43:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIEARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	90662256	07/04/2010	67,384,900.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
	TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

HIT : 900176099-2

113922

4

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 29,222
FECHA : ABRIL 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061141-00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:43:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Ur. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	90662271	15/04/2010	44,633,600.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	250,000.00
		TOTAL :	\$ 250,000.00

SON: DOSCIENTOS SESENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 May 2009 (07.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/058812 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 16/06 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)

Boulevard #453, Walnut Creek, California 94596 (US).
SHARMA, Mandakini [IN/US]; 563 Montego Terrace,
Sunnyvale, California 94089 (US).

(21) International Application Number:

PCT/US2008/081516

(74) Agents: PAZDERA, R. Minako et al.; 1 DNA Way, MS
49, South San Francisco, California 94080 (US).

(22) International Filing Date: 29 October 2008 (29.10.2008)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/983,825 30 October 2007 (30.10.2007) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-
TECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco,
California 94080 (US).

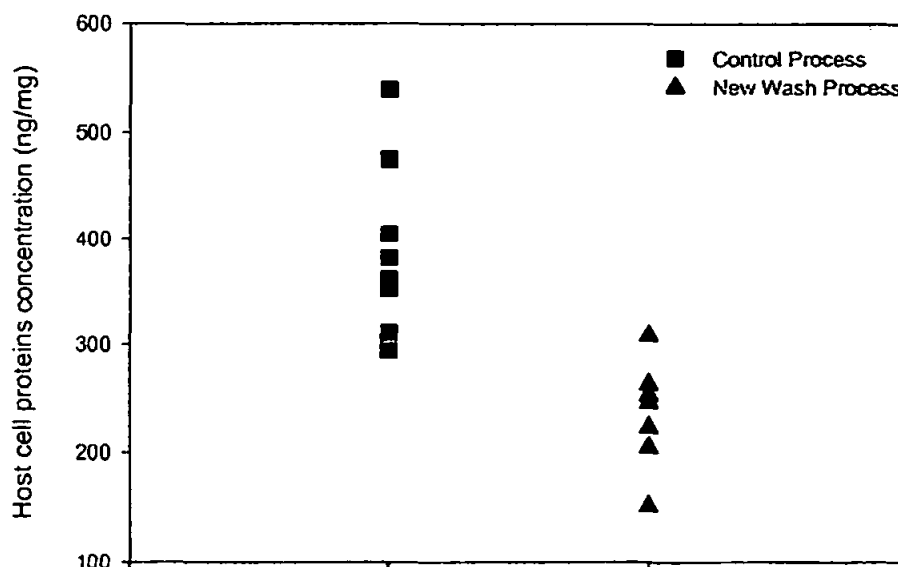
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LEBRETON, Bene-
dicte Andree [FR/US]; 1880 Vallejo Street #3, San Fran-
cisco, California 94123 (US). O'CONNOR, Deborah Ann
[US/US]; 1641 Cedar Street, San Carlos, California 94070
(US). SAFTA, Aurelia [US/US]; 1655 North California

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODY PURIFICATION BY CATION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

FIG. 3 – Host Cell Proteins Removal for Rituximab Processes



(57) Abstract: A method for purifying an antibody by cation exchange chromatography is described in which a high pH wash step is used to remove of contaminants prior to eluting the desired antibody using an elution buffer with increased conductivity.

WO 2009/058812 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
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
7 de Mayo de 2009 (07.05.2009)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/ 058812 A1

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/06 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional:
PCT/US2008/081516

(22) Fecha de Presentación Internacional:
29 de Octubre de 2008 (29.10.2008)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/983,825 30 de Octubre de 2007 (30.10.2007) EU

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de EU): GENENTECH, INC. [EU/EU]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (EU).

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente): LEBRETON, Benedicte Andree [EU/EU]; 1880 Vallejo Street #3 San Francisco, California 94123 (EU). O'CONNOR, Deborah Ann [EU/EU]; 1641 Cedar Street San Carlos, California 94070 (EU). SAFTA, Aurelia [EU/EU]; 1655 North California Boulevard #453 Walnut Creek, California 94596 (EU). SHARMA, Mandakini[EU/EU]; 563 Montego Terrace Sunnyvale, California 94089 (EU).
- (74) Agente: PAZDERA, R. Minako y otros; 1 DNA Way MS 49 South San Francisco, CA 94080 (EU).

(81) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): AE, AG, AL, 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

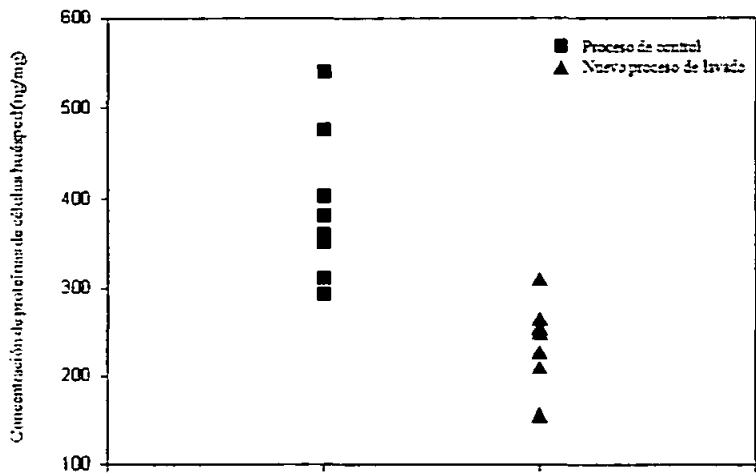
(84) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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).

Publicado:

 - con el informe internacional de búsqueda.
 - antes de la fecha límite de expiración para reivindicaciones modificadas y a ser republicado nuevamente en el evento de recibirlas
 - con el listado de secuencias como parte de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible bajo requerimiento de la Oficina Internacional.

(54) Título: COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DE LA QUINASA-1 SIMILAR AL RECEPTOR DE LA ACTIVINA

Figura 3 – Procesos de eliminación de proteínas celulares del huésped para rituximab



(57) Extracto: Se describe un método para la purificación de anticuerpo por cromatografía de intercambio catiónico en el que el paso de lavado a pH elevado se utiliza para eliminar los contaminantes antes de eluir el anticuerpo deseado utilizando una solución tampón de elución con conductividad aumentada.

5

**PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POR CROMATOGRAFÍA DE
INTERCAMBIO CATIÓNICO**

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de patente provisional
10 n.º 60/983825, presentada el 30 de octubre de 2007, cuya descripción se incorpora en su
totalidad en la presente memoria descriptiva para todos los efectos.

Antecedentes de la invención

Ámbito de la invención

La presente invención se relaciona, en general, con la purificación de proteínas. En
15 especial, la invención se relaciona con el método para la purificación de un anticuerpo
proveniente de una composición que comprende el anticuerpo y por lo menos un
contaminante que utiliza cromatografía de intercambio catiónico, donde un paso de lavado
con pH elevado se utiliza para eliminar contaminantes antes de eluir el anticuerpo deseado
utilizando una solución tampón con conductividad aumentada.

20

Descripción de los métodos relacionados

La purificación económica de las proteínas en gran escala es un problema cada vez
más importante para la industria de la biotecnología. Generalmente, las proteínas se
producen por cultivo celular, utilizando líneas celulares eucarióticas o procarióticas
25 diseñadas para producir la proteína de interés a través de la inserción de un plásmido
recombinante que contiene el gen para esa proteína. Debido a que las células que se
utilizan típicamente son organismos vivos, deben ser alimentadas con un medio de cultivo
complejo, que contiene azúcares, aminoácidos y factores de crecimiento, usualmente
derivados de preparaciones de suero animal. La separación de la proteína deseada de la
30 mezcla de compuestos proveídos a las células y de los subproductos de las células mismas
para alcanzar una pureza suficiente para uso terapéutico para seres humanos plantea un
desafío formidable.

Los procedimientos para la purificación de proteínas a partir de residuos de células
dependen inicialmente del sitio de expresión de la proteína. Se puede revestir a algunas
35 proteínas para que sean secretadas directamente de la célula al medio de cultivo que la
rodea, otras se elaboran adentro de la célula. Para las últimas proteínas, este primer paso
del proceso de purificación involucra lisis celular, que puede hacerse por diversos
métodos, incluyendo cortes mecánicos, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Esa
ruptura libera el contenido completo de la célula hacia el homogenizado y además,
40 produce fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño

5 tamaño. Generalmente, éstos se eliminan por centrifugación diferencial o por filtración. El mismo problema surge, en menor escala, con las proteínas secretadas directamente debido a la muerte natural de las células y la liberación de proteínas intracelulares de la célula huésped en el transcurso de la corrida de producción de proteínas.

Una vez se ha obtenido una solución aclarada que contiene la proteína de interés,
10 usualmente se intenta su separación de las demás proteínas producidas por la célula utilizando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan mezclas de proteínas con base en su carga, su grado de hidrofobicidad o su tamaño. Existen varias resinas cromatográficas diferentes disponibles para cada una de estas técnicas, las cuales permiten la adaptación exacta del proyecto de purificación de la
15 proteína individual en cuestión. La esencia de cada uno de estos métodos de separación es que se puede provocar la movilización de las proteínas a diferentes velocidades, hacia abajo, a lo largo de la columna, logrando una separación física que aumenta conforme bajan en la columna, o se adhieren selectivamente al medio de separación, siendo entonces eluidas diferencialmente con solventes diferentes. En algunos casos, la proteína deseada se
20 separa de las impurezas cuando éstas se adhieren específicamente a la columna y la proteína de interés no se adhiere, o sea, que la proteína de interés está presente en la parte que fluye ("flow-through").

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica cromatográfica que se utiliza con frecuencia en la purificación de proteínas. En la cromatografía de intercambio
25 iónico, las partes cargadas en la superficie del soluto son atraídas por cargas contrarias adheridas a una matriz cromatográfica, siempre que la fuerza iónica de la solución tampón que la rodea sea baja. Generalmente se alcanza la elución mediante el aumento de la fuerza iónica (es decir, la conductividad) de la solución tampón para competir con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Otra forma de lograr la elución del
30 soluto es cambiar el pH y así alterar la carga del soluto. El cambio de la conductividad o del pH puede ser gradual (elución de gradiente) o por pasos (elución por pasos). En el pasado, estos cambios han sido progresivos; es decir, se aumenta o reduce el pH o la conductividad en una única dirección.

Las patentes de EE.UU. n.º 6.339.142, 6.417.355, 6.489.447 y 7.074.404 (Basey y
35 *col.*) describen la cromatografía de intercambio iónico para la purificación de polipéptidos. Las patentes de EE.UU. n.º 6.127.526, 6.333.398, y 6.797.814 (Blank, G.) describen la purificación de proteínas, tales como los anticuerpos anti-HER2 mediante cromatografía de Proteína A. Los métodos para la purificación de proteínas, tales como los anticuerpos, mediante la cromatografía de intercambio iónico, se describen en la publicación de la
40 solicitud de patente de EE.UU. n.º 2004/0082047.

5 La patente de EE.UU. n.º 5.110.913 hace referencia a la purificación de un anticuerpo en solución acuosa mediante la unión del anticuerpo a una resina de intercambio iónico a un pH inicial de 4,6, seguido de lavado a un pH de 5,5 y elución del anticuerpo a pH de 6,5, donde la fuerza iónica de las soluciones de estos tres pasos permanece constante. Zhang y col. se refieren a la membrana Q, cromatografía de
 10 intercambio aniónico de un anticuerpo humano (Zhang y col. "Q Membrane Chromatography Application for Human Antibody Purification Process," Poster presentado en *BioProduction*, 26-27 de octubre. Munich, Alemania, 2004). Otras publicaciones acerca de la purificación de proteína incluyen: Barnthouse y col. *J. Biotech.* 66: 125-136 (1998); Blank y col. *Bioseparation* 10: 65-71 (2001); Follman y Fahrner *J. Chromatog.* 1024: 79-85 (2004); Iyer y col. *BioPharm* 15(1):14-16, 18, 20, 53 (2002);
 15 patente de EE.UU. n.º 2004/0082047A1; patentes europeas n.º 333.574; 460.426 B1; 556,083; documentos WO 89/05157; WO 92/22653; WO 93/06217; WO 95/22389; WO 96/33208; WO 96/40883; patentes de EE.UU. n.º 4.753.894; 4.966.851; 5.110.913; 5.112.951; 5.115.101; 5.118.796; 5.169.774; 5.196.323; 5.256.769; 5.279.823; 5.429.746;
 20 5.451.662; 5.525.338; 5.677.171; 6.005.081; 6.054.561; 6.127.526; 6.267.958; 6.339.142; 6.417.335 y 6.489.447; Adachi y col., *Journal of Chromatography A* 763(1-2):57-63 (Feb 28, 1997); Gagnon, P., *Purification Tools for Monoclonal Antibodies*, Tucson: Validated Biosystems, Inc., Capítulo 4, páginas 57-86 (1996); Graf y col., *Bioseparation* 4(1):7-20 (Feb 1994); Mhatre y col., *Journal of Chromatography A* 707(2):225-231 (Jul 21, 1995);
 25 Neidhardt y col., *Journal of Chromatography* 590(2):255-261 (1992); *Protein Purification Applications - A Practical Approach*, Harris y Angal, IRL Press, páginas 151-156 (1995); Sofer y col. *Handbook of Process Chromatography: A Guide to Optimization, Scale-up, and Validation*, San Diego: Academic Press, páginas 65-80 (1997); Tishchenko y col., *Journal of Chromatography B* 706(1):157-166 (Feb 27, 1998).

30 Resumen de la invención

La invención de la presente memoria descriptiva se refiere a un método mejorado para la cromatografía de intercambio catiónico de anticuerpos en el que se utiliza un paso de lavado a pH elevado para eliminar los contaminantes antes de eluir el producto de anticuerpos deseado. Este proceso tiene como resultado, entre otras cosas, una mejora en
 35 la eliminación de los contaminantes de las proteínas de ovario de hámster chino (CHOP).

Según el primer aspecto, la invención proporciona un método para la purificación de un anticuerpo a partir de una composición que comprende el anticuerpo y por lo menos un contaminante, cuyo método incluye los pasos secuenciales siguientes:

- 40 (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico, donde la composición se encuentra en un primer pH;
- (b) lavar el material de intercambio catiónico con una primera solución tampón a

5 un pH mayor que el de la composición (a), donde el pH de la primera solución tampón de lavado es de alrededor de 6,8 hasta alrededor de 9,0;

(c) lavar el material de intercambio catiónico con una segunda solución tampón de lavado a un pH que es menor que la solución tampón del primer lavado y

10 (d) eluir el anticuerpo del material de intercambio catiónico con la solución tampón de elución con una conductividad que es sustancialmente mayor que aquella de la solución tampón del segundo lavado.

Preferiblemente, el anticuerpo se une al CD20 humano, tal como rituximab, o se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tal como bevacizumab.

Según una forma de realización preferente, la presente invención se refiere a un
15 método para la purificación de un anticuerpo que se une a CD20 humano de una composición que comprende el anticuerpo de uno o más contaminantes seleccionados del grupo consistente de las proteínas ováricas de hámster chino (CHOP), proteína A lixiviada, ADN y anticuerpo CD20 agregado, del cual el método comprende los pasos secuenciales siguientes:

20 (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico, donde la composición está a un pH desde alrededor de 4,0 hasta alrededor de 6,0;

(b) lavar el material de intercambio catiónico con una solución tampón de primer lavado a un pH desde alrededor de 6,8 hasta alrededor de 9,0;

25 (c) lavar el material de intercambio catiónico con una solución tampón de segundo lavado a un pH desde alrededor de 5,0 hasta alrededor de 6,0; y

(d) eluir el anticuerpo del material de intercambio catiónico utilizando una solución tampón de elución con un pH desde alrededor de 5,0 hasta alrededor de 6,0 y una conductividad desde alrededor de 10 hasta alrededor de 100mS/cm. Preferiblemente, el anticuerpo CD20 es rituximab.

30 Según una forma de realización preferente, la presente invención se refiere a un método para la purificación de un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de una composición que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes seleccionados del grupo consistente de las proteínas ováricas de hámster chino (CHOP), ADN, contaminante viral y anticuerpo VEGF agregado, cuyo método
35 comprende los siguientes pasos secuenciales:

(a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico en donde la composición está a un pH aproximado de 4,0 a 6,0;

(b) lavar el material de intercambio catiónico con una solución tampón de primer lavado a un pH aproximado de 6,8 a 8,0;

40 (c) lavar el material de intercambio catiónico con una solución tampón de segundo lavado a un pH aproximado de 5,0 a 6,0; y

5 (d) eluir el anticuerpo del material de intercambio catiónico utilizando una solución tampón de elución con un pH aproximado de 5,0 a 6,0 y una conductividad desde alrededor de 10 hasta alrededor de 100mS/cm. Preferiblemente, el anticuerpo VEGF es bevacizumab.

La invención también se refiere a la composición que comprende rituximab en una
10 solución tampón que comprende alrededor de 25mM de HEPES a un pH de alrededor de 7,8.

Además, la invención proporciona una composición que comprende bevacizumab en una solución tampón que comprende alrededor de 25mM de MOPS a un pH de alrededor de 7,0.

15

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A y 1B proporcionan las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (identificador de secuencia n.º 1) y cadena ligera (identificador de secuencia n.º 2) del anticuerpo rituximab. Se identifican cada una de las regiones marco (FR1-4) y cada
20 una de las regiones CDR (CDR1-3) en cada región variable, al igual que la secuencia constante de cadena pesada de gamma 1 humana y la secuencia constante de cadena ligera kappa humana. La región variable de la cadena pesada (VH) se encuentra en la identificador de secuencia n.º 3. La región variable de la cadena ligera (VL) se encuentra en identificador de secuencia n.º 4. Los identificadores de secuencia para los CDR son:
25 CDR H1 (identificador de secuencia n.º 5), CDR H2 (identificador de secuencia n.º 6), CDR H3 (identificador de secuencia n.º 7), CDR L1 (identificador de secuencia n.º 8), CDR L2 (identificador de secuencia n.º 9) y CDR L3 (identificador de secuencia n.º 10).

Las figuras 2A y 2B proporcionan las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (identificador de secuencia n.º 11) y de la cadena ligera (identificador de secuencia
30 n.º 12) del anticuerpo bevacizumab. El final de cada región variable se indica con||. La región variable de la cadena pesada (VH) se encuentra en el identificador de secuencia n.º 13. La región variable de la cadena ligera (VL) se encuentra en el identificador de secuencia n.º 14. Cada uno de los tres CDR en cada región variable se encuentra subrayado. Los identificadores de secuencia para los CDR son: CDR H1 (identificador de
35 secuencia n.º 15), CDR H2 (identificador de secuencia n.º 16), CDR H3 (identificador de secuencia n.º 17), CDR L1 (identificador de secuencia n.º 18), CDR L2 (identificador de secuencia n.º 19) y CDR L3 (identificador de secuencia n.º 20).

La figura 3 proporciona una comparación de lado a lado de la eliminación de las proteínas de la célula huésped mediante el proceso de cromatografía de intercambio
40 catiónico del proceso mejorado de rituximab en comparación con el proceso original. Se logró una eliminación superior de CHOP con el nuevo proceso.

13

5

Descripción detallada de la forma de realización preferente

Definiciones:

En la presente memoria descriptiva, los rangos numéricos o cantidades anteceditas por el término "alrededor de" incluyen de forma expresa el rango exacto o la cantidad
10 numérica exacta.

La "composición" a ser purificada en la presente memoria descriptiva comprende el anticuerpo de interés y uno o más contaminantes. La composición puede estar "purificada parcialmente" (es decir, habiendo sido sometida a uno o más pasos de purificación) o puede ser obtenida directamente de una célula u organismo huésped que
15 produzca el anticuerpo (por ejemplo, la composición puede comprender un fluido de cultivo celular recolectado).

Según se utiliza en la presente memoria descriptiva, "polipéptido" se refiere generalmente a péptidos y proteínas que tienen más de diez aminoácidos. Preferiblemente, el polipéptido es una proteína de mamífero, por ejemplo: renina; una hormona del
20 crecimiento, que incluye la hormona del crecimiento humana y bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante de la tiroides; lipoproteínas; antitripsina alfa-1; cadena de la insulina A; cadena de la insulina B; pro-insulina; hormona folículoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIC, factor IX, factor tisular y factor de von
25 Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor atrial natriurético; surfactante pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa o activador plasminógeno de orina humana o de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopotoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (célula T expresada o secretada normalmente regulada en la activación);
30 proteína inflamatoria del macrófago humano (MIP-1-alfa); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana, sustancia inhibidora de Muellerian; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana tal como beta-lactamasa; DNAsa; IgE; un antígeno asociado al linfocito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial
35 vascular (VEGF); receptores para las hormonas o factores de crecimiento; Proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico tal como un factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ó -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento del nervio como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblasto como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico
40 (EGF); factor de crecimiento transformador (TGF) como alfa-TGF y beta-TGF; incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor de crecimiento parecido a la

5 insulina I y II (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (cerebro IGF-I), factor de crecimiento parecido a la insulina que une a las proteínas (IGFBP); proteínas CD como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína ósea morfogénica (BMP); un interferón como interferón alfa, beta y gama; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleuquinas
 10 (II), por ejemplo, IL-1 a IL-10; dismutasa superóxida; receptores de células T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de deterioro; antígeno viral como, por ejemplo, una porción del revestimiento del SIDA; proteínas de transporte; receptores locales; adreínas; proteínas de regulación; integrinas como CD11a, CD11b, CD11c, CD18 y ICAM, VLA-4 y VCAM; antígeno asociado a tumores como los receptores HER2, HER3
 15 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos listados anteriormente así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, unidos a cualquiera de los polipéptidos listados anteriormente. Un polipéptido preferente es un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo que se une al CD20 humano, por ejemplo, rituximab; o un anticuerpo intacto o un fragmento de anticuerpo que se une al factor de
 20 crecimiento endotelial vascular (VEGF), por ejemplo bevacizumab.

Un “contaminante” es un material que es diferente al producto de anticuerpo deseado. El contaminante incluye, entre otros: materiales provenientes de la célula huésped, tales como proteínas ováricas del hámster chino (CHOP); proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del anticuerpo deseado; otro
 25 polipéptido; endotoxina; contaminante viral; componente del medio de cultivo celular (*por ejemplo*, garamicina; GENTAMICINA®), etc.

La frase “material de intercambio catiónico” se refiere a una fase sólida que está cargada de forma negativa y tiene cationes libres para intercambiar con los cationes en una solución acuosa que pasa sobre o a través de la fase sólida. Se puede proporcionar la carga
 30 al adherir uno o más ligandos cargados a la fase sólida, *por ejemplo*, mediante uniones covalentes. Alternativamente, o además, la carga puede ser una propiedad inherente de la fase sólida (por ejemplo, el caso de sílica, que tiene una carga negativa total). Los materiales de intercambio catiónico comercialmente disponibles incluyen carboxi-metil-celulosa, BAKERBOND ABX™, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (*por ejemplo*,
 35 SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCET™, GE Healthcare), CAPTO S™ (GE Healthcare), FRACTOGEL-SO3™, FRACTOGEL-SE HICAP™ y FRACTOPREPT™ (EMD Merck), sulfonilo inmovilizado en agarosa (por ejemplo, S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de GE Healthcare) y SUPER SP™ (Tosoh Biosciences). Un material de intercambio catiónico
 40 preferente de la presente memoria descriptiva comprende un flujo cruzado por partículas

15

5 de poli(estireno-divinilbenceno) (fase sólida) revestidas con un polímero polihidroxilado que funciona con grupos de sulfopropilo (por ejemplo, resina cromatográfica POROS 50 HS®).

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la cual se pueden adherir uno o más ligandos cargados. La fase sólida puede ser una columna de purificación (que
10 incluye columnas de base expandida y base empacada, entre otras), una fase de partículas discretas discontinuas, una membrana o filtro, etc. Algunos ejemplos de materiales para la formación de la fase sólida incluyen polisacáridos (como agarosa y celulosa) y otras matrices mecánicamente estables, tales como sílica (por ejemplo, vidrio poroso controlado), poli(estireno-divinilbenceno), poliacrilamida, partículas cerámicas y
15 derivados de cualquiera de los materiales mencionados.

El término "carga" en la presente memoria descriptiva se refiere a la composición cargada sobre un material de intercambio catiónico. Preferiblemente, el material de intercambio catiónico se equilibra con una solución tampón de equilibrio antes de cargar la composición que se va a purificar.

20 Una "solución tampón" es una solución que resiste cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados de ácido-base. En la sección *Soluciones tampón* se describen varias soluciones tampón que se pueden utilizar dependiendo, por ejemplo, del pH deseado de la solución tampón. *A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems*, Gueffroy, D., Ed. Calbiochem Corporation (1975).

25 Una "solución tampón de equilibrio" es una solución tampón que se utiliza para equilibrar el material de intercambio catiónico, antes de cargar la composición que comprende el anticuerpo de interés y uno o más contaminantes sobre el material de intercambio catiónico. Preferiblemente, el pH de la solución tampón de equilibrio en la presente memoria descriptiva se encuentra en el rango de alrededor de 5,0 a 6,0; de
30 preferencia alrededor de 5,5. Preferiblemente, la conductividad de la solución tampón de equilibrio en la presente memoria descriptiva se encuentra en el rango de alrededor de 1 a 8mS/cm, de preferencia de alrededor de 4 a 8mS/cm y más preferentemente desde alrededor de 5 a 8mS/cm. De forma optativa, la solución tampón de equilibrio comprende una sal, como NaCl, por ejemplo, en una cantidad de alrededor de 40mM a 80mM,
35 preferentemente alrededor de 60mM NaCl.

El término "solución tampón de lavado" se utiliza en la presente memoria descriptiva para referirse a la solución tampón que se pasa sobre el material de intercambio catiónico después de la carga de una composición y antes de la elución de la proteína de interés. La solución tampón de lavado puede servir para eliminar uno o más
40 contaminantes del material de intercambio catiónico, sin elución sustancial del producto de anticuerpo deseado. De acuerdo a una forma de realización preferente de la invención en

5 la presente memoria descriptiva, se utilizan una "solución tampón de primer lavado" y una "solución tampón de segundo lavado".

En la presente memoria descriptiva, la expresión "solución tampón de primer lavado" se refiere a la solución de lavado que tiene un pH incrementado con relación al pH de la carga y/o de la solución tampón de equilibrio. Se puede utilizar la solución tampón de primer lavado en la presente memoria descriptiva para eluir uno o más contaminantes del material de intercambio catiónico, sin eluir sustancialmente el producto del anticuerpo de interés. El término "primero" no se debe interpretar como excluyente del uso de uno o más lavados adicionales u otras soluciones tampón entre la carga y la primera solución de lavado. Preferiblemente, el pH de la solución tampón del primer lavado en la presente memoria descriptiva se encuentra en el rango de alrededor de 6,8 a 9,0, de preferencia de alrededor de 7,0 a 8,0 y preferentemente un pH de alrededor de 7,0 o un pH de alrededor de 7,8. Preferiblemente, la conductividad de la solución tampón del primer lavado en la presente memoria descriptiva se encuentra en el rango de alrededor de 0,01 a 5mS/cm, de preferencia de alrededor de 0,1 a 3mS/cm y con mayor preferencia de alrededor de 0,2 a 20 2mS/cm. De forma opcional, la solución tampón del primer lavado se encuentra sustancialmente libre de una sal (como NaCl).

Para los propósitos de esta aplicación, la expresión "solución tampón de segundo lavado" se refiere a la solución tampón de lavado utilizada después de la solución tampón de primer lavado para la preparación del material de intercambio catiónico para la elución del anticuerpo de interés. El término "segundo" no se debe interpretar como excluyente del uso de uno o más lavados adicionales u otras soluciones tampón entre la primera y la segunda solución de lavado. Preferentemente, el pH de la solución tampón del segundo lavado en la presente memoria descriptiva se encuentra en el rango de alrededor de 5,0 a 6,0, de preferencia alrededor de 5,5 y con mayor preferencia a pH 5,5. Preferiblemente, la conductividad de la solución tampón del segundo lavado en la presente memoria descriptiva se encuentra en el rango de alrededor de 0,01 a 5 mS/cm, de preferencia alrededor de 0,1 a 3 mS/cm y con mayor preferencia de alrededor de 0,5 a 3,0 mS/cm.

Se utiliza la "solución tampón de elución" para eluir el anticuerpo de interés de la fase sólida. En la presente memoria descriptiva, la solución tampón de elución tiene una conductividad aumentada sustancialmente en relación con la de la solución tampón del segundo lavado, para que el producto del anticuerpo deseado sea eluido del material de intercambio catiónico. Preferiblemente, la conductividad de la solución de elución es sustancialmente mayor que la de la carga y cada una de las soluciones anteriores, o sea, la de la solución tampón de equilibrio, la solución de primer lavado y la solución tampón del segundo lavado. Por conductividad "sustancialmente mayor" se refiere, por ejemplo, a que 40 la solución tampón tiene una conductividad que es al menos 2, 3, 4, 5 ó 6 unidades de

5 conductividad (mS/cm) mayor que la composición o la solución tampón con la que se hace la comparación. En una forma de realización, el pH de la solución tampón de elución es sustancialmente la misma que la de equilibrio y/o la solución tampón del segundo lavado. Preferentemente, el pH de la solución tampón de elución en la presente memoria descriptiva se encuentra en el rango de alrededor de 5,0 a 6,0, de preferencia alrededor de
10 5,5 y con mayor preferencia a un pH de 5,5. Preferentemente, la conductividad de la solución tampón de elución de la presente memoria descriptiva se encuentra en el rango de alrededor de 10mS/cm a 100mS/cm, de preferencia de alrededor de 12mS/cm a 30mS/cm y con mayor preferencia de alrededor de 12mS a 20mS/cm. Se puede lograr la conductividad aumentada mediante la adición de una sal, tal como cloruro de sodio,
15 acetato de sodio o cloruro de potasio a la solución tampón de elución. Preferentemente, la solución tampón de elución comprende de alrededor de 100 a 300mM de NaCl, de preferencia de alrededor de 150mM a 200mM NaCl, por ejemplo alrededor de 175mM de NaCl o alrededor de 160mM de NaCl.

Se puede utilizar una "solución tampón de regeneración" para regenerar el material
20 de intercambio catiónico para que pueda reutilizarse. La solución tampón de regeneración tiene una conductividad y/o pH según sea necesario para eliminar sustancialmente todos los contaminantes y el anticuerpo de interés del material de intercambio catiónico.

El término "conductividad" se refiere a la habilidad de una solución acuosa de conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En una solución, la corriente fluye
25 mediante transporte de iones. Por lo tanto, con un incremento de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá mayor conductividad. La unidad básica de medición de la conductividad es el Siemen (o mho), mho (mS/cm) y se puede medir utilizando un medidor de conductividad, como los diversos modelos de medidores de conductividad Orion. Debido a que la conductividad electrolítica es la capacidad de los iones en una
30 solución de transportar una corriente eléctrica, se puede alterar la conductividad de una solución al cambiar la concentración de los iones en la misma. Por ejemplo, se puede alterar la concentración de un agente de una solución tampón y/o la concentración de una sal (*por ejemplo*, cloruro de sodio, acetato de sodio o cloruro de potasio) en la solución para llegar a la conductividad deseada. Preferentemente, se modifica la concentración de
35 sal de varias soluciones tampón para alcanzar la conductividad deseada.

El término "purificación" de un anticuerpo de una composición que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes es el aumento del grado de pureza del anticuerpo en la composición al eliminar (completa o parcialmente) por lo menos un contaminante de la composición. Un "paso de purificación" puede ser parte de un proceso total de
40 purificación que da como resultado una composición "homogénea". El término "homogénea" se utiliza en la presente memoria descriptiva para referirse a una

5 composición que comprende por lo menos alrededor del 70% en peso del anticuerpo de interés, sobre la base del peso total de la composición, preferentemente por lo menos alrededor del 80% en peso, con mayor preferencia alrededor del 90% en peso y aún con mayor preferencia alrededor del 95% en peso.

10 El término "unión" de una molécula al material de intercambio catiónico se refiere a la exposición de la molécula a material de intercambio catiónico en condiciones apropiadas (pH y/o conductividad), de tal modo que la molécula sea inmovilizada reversiblemente en o sobre el material de intercambio catiónico en virtud de las interacciones iónicas entre la molécula y el grupo o grupos cargados de material de intercambio catiónico.

15 "Lavar" el material de intercambio catiónico significa pasarlo a través de soluciones tampón apropiadas o sobre el material intercambio catiónico.

La "elución" de una molécula (*por ejemplo*, anticuerpo o contaminante) de un material de intercambio catiónico significa la eliminación de la molécula del mismo.

20 En formas de realización preferentes de la invención, la purificación del anticuerpo en esta memoria descriptiva es un anticuerpo recombinante. Un "anticuerpo recombinante" es el que ha sido producido en una célula huésped, la cual ha sido transformada o transfectada con ácido nucleico que lo codifica o produce el anticuerpo como resultado de una recombinación homóloga. La "transformación" y la "transfección" se utilizan indistintamente para referirse al proceso de introducir ácido nucleico en una
25 célula. Después de la transformación o transfección, el ácido nucleico se puede integrar en el genoma de la célula huésped o puede existir como un elemento extracromosómico. La "célula huésped" incluye una célula en cultivo celular *in vitro* al igual que en un animal huésped. Los métodos para la producción recombinante de polipéptidos se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.534.615, expresamente incorporada en la presente memoria
30 descriptiva como referencia, como ejemplo.

Una "variante" o "variante de la secuencia de aminoácidos" de un polipéptido inicial es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos diferente de aquella del polipéptido inicial. Generalmente, una variante poseerá por lo menos 80% de identidad de secuencia, preferentemente por lo menos 90% de identidad de secuencia, con mayor
35 preferencia por lo menos 95% de identidad de secuencia y más preferentemente por lo menos 98% de identidad de secuencia con el polipéptido original. Se determina el porcentaje de identidad de secuencia, por ejemplo, por la versión de Fitch y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1382-1386 (1983) del algoritmo descrito por Needleman y *col.*, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970), después de alinear las secuencias para proporcionar la
40 homología máxima. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido se pueden preparar mediante la introducción de cambios adecuados de nucleótidos en la

5 codificación del ADN del polipéptido o mediante la síntesis de péptidos. Estas variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del polipéptido de interés y/o inserciones de dichos residuos y/o sustituciones de los mismos. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para
 10 llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de los aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traslación del polipéptido, como por ejemplo, cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación. Otras modificaciones posteriores a la traslación incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo, treonilo o tirosilo, la metilación de los grupos de α -amino de las
 15 cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)). Los métodos para la generación de variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.534.615, expresamente incorporada en la presente memoria descriptiva a modo de referencia, como ejemplo.

20 El término "anticuerpo" se usa en el más amplio sentido y abarca específicamente los anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, los anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad de unión deseada.

25 En esta memoria descriptiva, el anticuerpo se dirige contra un "antígeno" de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante, y la administración del anticuerpo a un mamífero que padezca una enfermedad o un trastorno puede resultar en un beneficio terapéutico para dicho mamífero. Sin embargo, también se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (como los
 30 antígenos de glicolípidos asociados a un tumor; véase la patente de EE.UU. n.º 5.091.178). Donde el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula de transmembrana (*por ejemplo*, un receptor) o un ligando como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen aquellos polipéptidos que se trataron anteriormente. Los objetivos moleculares preferidos para los anticuerpos comprendidos en la presente invención
 35 incluyen polipéptidos CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia de receptores HER, tales como el receptor EGF (HER1), HER2, HER3 o el receptor HER4; moléculas de adhesión celular como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina $\alpha v\beta 3$, que incluyen las subunidades α o β de los mismos (*por ejemplo*, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento como
 40 VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; polipéptido C, etc. Los antígenos solubles o fragmentos de los

20

5 mismos, conjugados opcionalmente con otras moléculas, se pueden utilizar como
 inmunógenos para la generación de anticuerpos. En el caso de moléculas transmembrana,
 como los receptores, los fragmentos de las mismas (por ejemplo, el dominio extracelular
 de un receptor) se pueden utilizar como el inmunógeno. Alternativamente, las células que
 expresan la molécula transmembrana se pueden usar como el inmunógeno. Dichas células
 10 pueden ser derivadas de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o
 pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar
 la molécula transmembrana.

Entre los ejemplos de anticuerpos a ser purificados que se mencionan en la presente
 memoria descriptiva se incluyen: anticuerpos HER2, que incluyen trastuzumab
 15 (HERCEPTIN®) (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992), patente
 de EE.UU. n.º 5.725.856) y pertuzumab (OMNITARG™) (documento WO01/00245);
 anticuerpos CD20 (véase más adelante); anticuerpos IL-8 (St John y col., *Chest*, 103:932
 (1993) y la publicación internacional n.º WO 95/23865); anticuerpos VEGF o del receptor
 VEGF que incluyen anticuerpos VEGF humanizados y/o madurados por afinidad como el
 20 anticuerpo VEGF humanizado huA4.6.1 bevacizumab (AVASTIN®) y ranibizumab
 (LUCENTIS®) (Kim y col., *Growth Factors*, 7:53-64 (1992), publicaciones
 internacionales n.º WO 96/30046 y WO 98/45331, publicadas el 15 de octubre de 1998);
 anticuerpos PSCA (documento WO01/40309); anticuerpos CD11a, que incluyen
 efalizumab (RAPTIVA®) (patente de EE.UU. n.º 5.622.700, documento WO 98/23761,
 25 Steppe y col., *Transplant Intl.* 4:3-7 (1991), y Hourmant y col., *Transplantation* 58:377-
 380 (1994)); anticuerpos que unen IgE, que incluyen omalizumab (XOLAIR®) (Presta y
 col., *J. Immunol.* 151:2623-2632 (1993) y publicación internacional n.º WO 95/19181;
 patente de EE.UU. n.º 5.714.338, emitida el 3 de febrero de 1998 o patente de EE.UU. n.º
 5.091.313, emitida el 25 de febrero de 1992, documento WO 93/04173 publicado el 4 de
 30 marzo de 1993, o solicitud internacional n.º PCT/US98/13410 registrada el 30 de junio de
 1998, patente de EE.UU. n.º 5.714.338); anticuerpos CD18 (patente de EE.UU. n.º
 5.622.700, emitida el 22 de abril de 1997, o como en el documento WO 97/26912,
 publicado el 31 de Julio de 1997); anticuerpos del receptor de anticuerpo Apo-2
 (documento WO 98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998); anticuerpos de factor
 35 tisular (TF) (patente europea n.º 0 420 937 B1 otorgada el 9 de noviembre de 1994);
 anticuerpos de integrina $\alpha_4\text{-}\alpha_7$ (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero de
 1998); anticuerpos EGFR (por ejemplo, anticuerpo 225 quimerizado o humanizado,
 cetuximab, ERBUTIX® como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de
 diciembre de 1996); anticuerpos CD3 como OKT3 (patente de EE.UU. n.º 4.515.893
 40 emitida el 7 de mayo de 1985); anticuerpos CD25 o Tac como CHI-621 (SIMULECT®) y
 ZENAPAX® (véase la patente de EE.UU. n.º 5.693.762 emitida el 2 de diciembre de

5 1997); anticuerpos CD4 como el anticuerpo cM-7412 (Choy y col. *Arthritis Rheum* 39(1):52-56 (1996)); anticuerpos CD52 como CAMPATH-1H (ILEX/Berlex) (Riechmann y col. *Nature* 332:323-337 (1988)); anticuerpos receptores Fc como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc(RI como en Graziano y col. *J. Immunol.* 155(10):4996-5002 (1995); anticuerpos del antígeno carcinoembrionario (CEA) como hMN-14 (Sharkey y col. *Cancer*
 10 *Res.* 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995)); anticuerpos dirigidos contra las células epiteliales de seno que incluyen huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani y col. *Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s (1995) y Richman y col. *Cancer Res.* 55(23 Suppl): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a las células del carcinoma de colon, como C242 (Litton y col. *Eur J. Immunol.* 26(1):1-9 (1996)); anticuerpos CD38, *por ejemplo*, AT 13/5 (Ellis y col. *J. Immunol.* 155(2):925-937 (1995)); anticuerpos CD33 como Hu M195 (Jurcic y col. *Cancer Res* 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995)) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos EpCAM como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos GpIIb/IIIa como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticuerpos RSV como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos CMV como PROTOVIR®; anticuerpos VIH como PRO542; anticuerpos de hepatitis como el
 20 anticuerpo Hep B OSTAVIR®; anticuerpo CA 125 OvaRex; anticuerpo del epítipo GD3 idiopático; anticuerpo BEC2; anticuerpo $\alpha\beta 3$ (*por ejemplo*, VITAXIN®; Medimmune); anticuerpo de carcinoma de células renales humanas como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-humano 17-1An (3622W94); anticuerpo anti-humano de tumor colorectal (A33); anticuerpo anti-humano de melanoma R24 dirigido contra el gangliósido GD3; carcinoma
 25 anti-humano de células escamosas (SF-25); anticuerpo del antígeno leucocítico humano (HLA) como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1); anticuerpo CD37 como TRU 016 (Trubion); anticuerpo IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk); anticuerpo celular anti-B (Impheron); célula B dirigida al objetivo MAb (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad 131 (HGS); anticuerpo Lym-1, como Lym -1Y-90 (USC) o anti-Lym-1 Oncolym (USC/Peregrine); LIF 226 (Enhanced Lifesci.); anticuerpo BAFF (*por ejemplo*, WO 03/33658); anticuerpo receptor BAFF (véase *por ejemplo*, el documento WO 02/24909); anticuerpo BR3; anticuerpo Blys como belimumab; LYMPHOSTAT -B™; ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idex 152; Biogen Idec); anticuerpo receptor IL-6 como atlizumab (ACTEMRA™; Chugai/Roche); anticuerpo IL-15 como HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen); anticuerpo receptor quemoquina, como un anticuerpo CCR2 (*por ejemplo*, MLN1202; Millienneum); anticuerpo anti-complemento, como anticuerpo C5 (*por ejemplo*, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulación oral de inmunoglobulina humana (*por ejemplo*, IgPO; Protein Therapeutics); anticuerpo IL-12 como ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-
 40 224818; BMS); anticuerpos CD4, que incluyen S2C6 y variantes humanizadas de las mismas (WO00/75348) y TNX 100 (Chiron/Tanox); anticuerpos TNF- α que incluyen cA2

22

5 o infliximab (REMICADE®), CDP571, MAK-195, adalimumab (HUMIRA™), anticuerpo pegilado del fragmento TNF- α como CDP-870 (Celltech), D2E7 (Knoll), anticuerpo policlonal anti-TNF- α (*por ejemplo*, PassTNF; Verigen); anticuerpos CD22 como LL2 o epratuzumab (LYMPHOCIDE®; Immunomedics), que incluyen epratuzumab Y-90 y epratzumab I-131, anticuerpo CD 22 de Abiogen (Abiogen, Italia), CMC 544
10 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Southwestern), BL22 (NIH) y LympoScan Tc99 (Immunomedics). Preferiblemente, el anticuerpo que es purificado en la presente memoria descriptiva es un anticuerpo desnudo, intacto, que se une al CD20 humano, o a un anticuerpo desnudo, intacto, que se une al VEGF humano.

El "antígeno humano CD20", o "CD20", es una fosfoproteína no glicosilada, de
15 alrededor de 35-kDa, que se encuentra en la superficie de más del 90% de las células B de la sangre periférica o de los órganos linfoides. El CD20 está presente tanto en linfocitos B normales como malignos, pero no se expresa en las células madre. Otros nombres que se dan al CD20 en la bibliografía son "antígeno restringido a linfocitos B" y "Bp35". El antígeno CD20 se describe en Clark y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1766 (1985),
20 por ejemplo.

En la presente memoria descriptiva, un "antagonista anticuerpo del CD20" es un anticuerpo que, al unirse al CD20 en las células B, destruye o reduce las células B del sujeto y/o interfiere en una o más de las funciones de las células B, *por ejemplo*, disminuyendo o impidiendo la respuesta humoral que las células B provocan. El
25 antagonista anticuerpo es preferentemente capaz de reducir las células B (*es decir*, disminuir los niveles de células B circulantes) en un sujeto tratado con dicho antagonista. Se puede conseguir esta reducción a través de diversos mecanismos, como la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), la inhibición de la proliferación de células B y/o la
30 inducción de la muerte de las células B (*por ejemplo*, por la vía de la apoptosis).

Según se usa en la presente memoria descriptiva, la "reducción de células B" se refiere a la reducción de los niveles de células B en un animal o un humano, generalmente después del tratamiento con el fármaco o el anticuerpo, en comparación con los niveles anteriores al tratamiento. La reducción de células B puede ser parcial o completa. Los
35 niveles de las células B se pueden medir utilizando técnicas conocidas como las descritas en Reff y col., *Blood* 83: 435 -445 (1994), o en la patente de EE.UU. n.º 5.736.137 (Anderson y col.). A modo de ejemplo, se puede tratar a un mamífero (*por ejemplo*, a un primate normal) con varias dosis del anticuerpo o inmunoadhesina, y se pueden determinar las concentraciones periféricas de células B, *por ejemplo*, por el método FACS que cuenta
40 células B.

5 Ejemplos de anticuerpos anti-CD20 son: "C2B8," que actualmente se llama
 "rituximab" ("RITUXAN®") (patente de EE.UU. n.º 5.736.137); el anticuerpo murino
 2B8 marcado con itrio-[90] denominado "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan"
 (ZEVALIN®) comercializado por IDEC Pharmaceuticals, Inc. (patente de EE.UU. n.º
 5.736.137; 2B8 inscrita en el ATCC con el n.º HB11388 el 22 de junio de 1993); IgG2a
 10 murina "B1," también llamada "tositumomab," opcionalmente marcado con ¹³¹I para
 generar el "¹³¹I-B1" o anticuerpo "tositumomab marcado con yodo I¹³¹" (BEXXAR™),
 comercializado por Corixa; (véase, además, patente de EE.UU. n.º 5.595.721); anticuerpo
 monoclonal murino "1F5" (Press y col., *Blood* 69 (2):584-591 (1987) y variantes del
 mismo incluyendo un "marco de parches" o 1F5 humanizado (documento WO
 15 2003/002607, Leung, S.; depósito en la ATCC HB-96450); el anticuerpo murino anti-2H7
 y el quimérico anti-2H7 (patente de EE.UU. n.º 5.677.180); el anti-2H7 humanizado
 (documento WO 2004/056312, (Lowman y col.), y como se establece más adelante);
 HuMax-CD20, un anticuerpo totalmente humano, de alta afinidad, dirigido a la molécula
 del CD20 en la membrana celular de las células B (Genmab, Dinamarca; véase, por
 20 ejemplo, Glennie y Van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) y Cragg y
 col., *Blood*. 101: 1045-1052 (2003); documento WO 2004/035607; documento
 US2004/0167319); los anticuerpos monoclonales humanos especificados en los
 documentos WO 2004/035607 y US2004/0167319 (Teeling y col.); los anticuerpos con
 cadenas complejas de azúcares enlazadas a N-glicósidos y unidas a la región Fc descrita en
 25 el documento US 2004/0093621 (Shitara y col.); los anticuerpos monoclonales y los
 fragmentos de unión a antígeno que se unen al CD20 (documento WO 2005/000901,
 Tedder y col.) como el HB20-3, el HB20-4, el HB20-25 y el MB20-11; las moléculas de
 unión al CD20 como la serie AME de anticuerpos, *por ejemplo*, los anticuerpos AME 33
 tal como se especifican en los documentos WO 2004/103404 y US2005/0025764 (Watkins
 30 y col., Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); las moléculas de unión al CD20
 como las descritas en el documento US 2005/0025764 (Watkins y col.); el anticuerpo A20
 o las variantes del mismo como el anticuerpo A20 quimérico o humanizado (cA20 y hA20,
 respectivamente) (documento US 2003/0219433, Immunomedics); los anticuerpos de
 unión al CD20, incluyendo el Leu-16 con reducción de epítomos, el 1H4 o el 2B8,
 35 opcionalmente conjugados con IL-2, como se indica en los documentos US
 2005/0069545A1 y WO 2005/16969 (Carr y col.); el anticuerpo biespecífico que se une al
 CD22 y el CD20, por ejemplo, el hLL2xhA20 (documento WO2005/14618, Chang y col.);
 los anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles a través del
 International Leukocyte Typing Workshop (Valentine y col., en: *Leukocyte Typing III*
 40 (McMichael, Ed., pág. 440, Oxford University Press (1987)); 1H4 (Haisma y col. *Blood*
 92:184 (1998)); conjugado anti-CD20 auristatina (Seattle Genetics); anti-CD20-IL2

5 (EMD/Biovation/City of Hope); terapia Mab anti-CD20 (EpiCyte); anticuerpo TRU 015 anti-CD20 (Trubion). En la presente memoria descriptiva, los anticuerpos CD20 preferentes son anticuerpos CD20 humanos, humanizados o quiméricos, más preferentemente rituximab, el anticuerpo 2H7 humanizado, el anticuerpo humano CD20 2F2 (Hu-Max-CD20), el anticuerpo CD20 humano (Genmab) y el anticuerpo A20
10 humanizado o IMMUN-106 (Immunomedics).

Para los propósitos de la presente memoria descriptiva, los términos "rituximab," "RITUXAN®," y "C2B8" se refieren al anticuerpo quimérico recombinante que se une al antígeno CD20 humano como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.736.137, Anderson y col. Ese anticuerpo preferentemente comprende una cadena pesada que
15 comprende a CDR H1 (identificador de secuencia n.º 5), CDR H2 (identificador de secuencia n.º 6), CDR H3 (identificador de secuencia n.º 7) y una cadena ligera, donde la cadena ligera preferentemente comprende CDR L1 (identificador de secuencia n.º 8), CDR L2 (identificador de secuencia n.º 9) y CDR L3 (identificador de secuencia n.º 10); preferentemente la cadena pesada comprende una región variable pesada (VH) que
20 comprende la identificador de secuencia n.º 3 y una región variable ligera (VL) que comprende la identificador de secuencia n.º 4; y más preferentemente comprende una cadena pesada que comprende la identificador de secuencia n.º 1 (con o sin un residuo de lisina C-terminal) y una cadena ligera, donde la cadena ligera preferentemente comprende identificador de secuencia n.º 2. Los términos expresamente incluyen formas variantes
25 como las descritas en Moorhouse y col. *J. Pharm Biomed. Anal.* 16:593-603 (1997).

El término "VEGF humano" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere al factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos y a los factores de crecimiento celular endotelial vascular humano relacionados con los aminoácidos 121-, 189- y 206- , según se describe en Leung y col. *Science*, 246:1306
30 (1989), y Houck y col. *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991), junto con las formas alélicas naturales y procesadas de los mismos.

La presente invención proporciona los anticuerpos antagonistas anti-VEGF, que tienen la capacidad de inhibir una o más de las actividades biológicas del VEGF, por ejemplo, su actividad mitogénica o angiogénica. Los antagonistas del VEGF actúan al
35 interferir con la unión del VEGF a un receptor celular, al incapacitar o matar células que han sido activadas por el VEGF, o mediante la interferencia de la activación celular endotelial vascular después de la unión de VEGF a un receptor celular. Para los propósitos de esta invención, se deben considerar equivalentes todos los puntos de intervención por un antagonista VEGF.

40 Para los propósitos de la presente memoria descriptiva, los términos "bevacizumab," "AVASTIN®," y "F(ab)-12" y "rhuMab VEGF " se refieren al

25

5 anticuerpo monoclonal recombinante que se une al factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF) antígeno (rumba VEGF) como se describe en la patente de EE.UU. n.º 7,169,901, Presta y col. Ese anticuerpo preferentemente comprende una cadena pesada que comprende a CDR H1 (identificador de secuencia n.º 15), CDR H2 (identificador de secuencia n.º 16), CDR H3 (identificador de secuencia n.º 17) y una
10 cadena ligera, donde la cadena ligera preferentemente comprende CDR L1 (identificador de secuencia n.º 18), CDR L2 (identificador de secuencia n.º 19) y CDR L3 (identificador de secuencia n.º 20); preferentemente la cadena pesada comprende una región variable pesada (VH) que comprende la identificador de secuencia n.º 13 y una región variable ligera (VL) que comprende la identificador de secuencia n.º 14; y más preferentemente
15 comprende una cadena pesada que comprende la identificador de secuencia n.º 11 (con o sin un residuo de lisina C-terminal) y una cadena ligera, donde la cadena ligera preferentemente comprende identificador de secuencia n.º 12. Los términos expresamente incluyen formas variantes que se forman durante la producción del producto del anticuerpo recombinante.

20 El término “anticuerpo monoclonal”, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se entiende un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos, excepto en posibles mutaciones de formación natural que pueden estar presentes en cantidades insignificantes. Los anticuerpos monoclonales son altamente
25 específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales) que suelen incluir distintos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo del que se ha obtenido de una población de
30 anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que sea necesario producir el anticuerpo utilizando un método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se deben usar de acuerdo con la presente invención se pueden conseguir por el método del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o con ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la patente de EE.UU. n.º
35 4.816.567). En otra forma de realización, se pueden aislar los “anticuerpos monoclonales” de bibliotecas de fagos de anticuerpos generados mediante las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las
40 publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante combinación de cadenas (Marks y col., *BioTechnology*,

5 10:779-783 (1992)), así como una infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para el aislamiento de anticuerpos monoclonales. Como alternativa, actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, una vez inmunizados, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos cuando no exista producción de inmunoglobulina endógena alguna. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región (J_H) del anticuerpo que se une a la cadena pesada en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal inhibe por completo la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en la línea germinal de dicho ratón mutante ocasionará la producción de anticuerpos humanos frente al antígeno presentado. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Duchosal y col., *Nature* 355:258 (1992).

En la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente los anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en las que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica o presenta homología con respecto a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos concreta, mientras que las demás cadenas son homólogas a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n.º 4.816.567 y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

El término "región hipervariable", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región de determinación de complementariedad" o "CDR" (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Los residuos de un "marco" o "FR"

5 son aquellos residuos de un dominio variable distintos a los de una región hipervariable, tal como se define en la presente memoria descriptiva.

Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, los murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son
 10 inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por los residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como el ratón, la rata, el conejo o los primates no humanos, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus
 15 correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o donante. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, o al menos uno, y típicamente dos, en los que todos, o sustancialmente todos, los
 20 bucles hipervariables correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las FR sean las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente una inmunoglobulina humana.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se
 25 utilizarán en la realización de los anticuerpos humanizados es muy importante para disminuir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método del "más apto", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor se compara con toda la biblioteca conocida de secuencias de dominio variable de humanos. Entonces, se acepta la secuencia humana más parecida a la de los roedores como estructura humana (FR) para el anticuerpo
 30 humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)).

Otro método utiliza una estructura concreta derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura se puede utilizar para diferentes anticuerpos humanizados (Carter y
 35 col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen conservando una afinidad alta al antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, siguiendo el procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan
 40 mediante un proceso de análisis de secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y de las

5 humanizadas. Generalmente se dispone de modelos de inmunoglobulina tridimensional conocidos por los expertos en la materia. Existen programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionada. La inspección de estas visualizaciones permite analizar el papel que es probable que desempeñen los residuos en el funcionamiento de la

10 secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación para lograr la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo una mayor afinidad por el antígeno o antígenos objetivo. En general, los residuos

15 de CDR influyen directa y sustancialmente en la unión al antígeno.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región variable o de unión al antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos serían los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, los diacuerpos, los anticuerpos lineales, las moléculas anticuerpos de cadena única y los

20 anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24:107-117 (1992) y Brennan y col., *Science*, 229:81 (1985)). Sin

25 embargo, ahora se pueden producir estos fragmentos directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden obtener directamente de *E. coli* y unir químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). En otra forma de realización, el

30 fragmento F(ab')₂ se forma utilizando la cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula de F(ab')₂. Según otro planteamiento, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente de cultivos de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los profesionales expertos.

35 En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase el documento WO 93/16185. Los fragmentos "Fv de cadena simple" o "sFv" de un anticuerpo comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo presentes en una cadena simple de polipéptidos. Por lo general, el polipéptido de Fv comprende también un enlazador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite

40 que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los

5 sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore editores, (Springer-Verlag, New York, páginas 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptidos ($V_H - V_L$). Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, estos dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, la patente europea 404.097, el documento WO 93/11161 y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpos lineales" cuando se utiliza a lo largo de esta solicitud se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata y col., *Polypeptide Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los "anticuerpos multiespecíficos" tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, donde los epítopos usualmente son de antígenos diferentes. Mientras que dichas moléculas por lo general sólo unen dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como los anticuerpos triespecíficos, se engloban en esta expresión cuando se utilizan en la presente memoria descriptiva. Los ejemplos de BsAbs incluyen a aquellos con un ramal dirigido contra un antígeno de la célula tumoral y el otro ramal dirigido contra una molécula activadora citotóxica como la anti-Fc γ RI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/Fc γ RIII (CD16), anti-CD3/célula B antimaligna (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/carcinoma celular antirrenal, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (carcinoma anticolon), anti-CD3/análogo de la hormona estimuladora antimelanocito, receptor anti-EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, molécula de adhesión celular antineural (NCAM)/anti-CD3, proteína de unión antifolato (FBP)/anti-CD3, antígeno asociado al carcinoma anti-pan (AMOC-31)/anti-CD3; BsAbs con un ramal que se une específicamente a un antígeno tumoral y un ramal que se une a una toxina como anti-saporin/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporin, anti-CD7/anti-saporin, anti-CD38/anti-saporin, anti-CEA/cadena A antirricino, antiinterferón- α (IFN- α)/idiotipo antihibridoma, anti-CEA/alcaloide antivinca; BsAbs para convertir los profármacos de enzimas activadas como la fosfatasa anti-CD30/antialcalina (que cataliza la conversión del profármaco fosfato de mitomicina en alcohol de mitomicina); BsAbs que pueden usarse como agentes fibrinolíticos como el activador plasminógeno

5 antifibrina/antitislular (tPA), el activador plasminógeno de tipo antifibrina/antiuroquinasa (uPA); BsAbs dirigidos a objetivos complejos inmunes a los receptores de la superficie celular como la antilipoproteína de baja densidad (LDL)/receptor anti-Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII o FcγRIII); BsAbs para uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas como virus simplex anti-CD3/anti-herpes (HSV), receptor anticélula T:CD3
 10 complejo/antigripal, anti-FcγR/anti-HI; BsAbs para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo* como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; BsAbs como adyuvantes de vacuna; y BsAbs como herramientas de diagnóstico como anticonejo IgG/antiferritina, peroxidasa de rábano picante (HRP)/antihormona, antisomatostatina/antisustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-β-galactosidasa. Los
 15 ejemplos de anticuerpos triespecíficos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden
 20 preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., *J. Immunol.*, 147: 60 (1991).

Para los propósitos de la presente memoria descriptiva, por "anticuerpo desnudo" se entiende un anticuerpo que no se conjuga con una fracción citotóxica o un radiomarcador.

En la presente memoria descriptiva, un "anticuerpo intacto" es aquel que comprende dos regiones de unión a antígeno y una región Fc. El anticuerpo intacto tiene
 25 preferentemente una región Fc funcional.

Por "tratamiento" se entiende tanto el tratamiento terapéutico como las medidas profilácticas o preventivas. Entre los sujetos que necesitan tratamiento se incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que debe prevenirse el trastorno.

30 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo purificado, según se describe en la presente memoria descriptiva. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas y aquellos procesos patológicos que predisponen al mamífero a adquirir el trastorno en cuestión.

La palabra "marcador" utilizada en la presente memoria descriptiva, se refiere a un
 35 compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un sustrato de compuestos o composiciones que sea detectable.

El término "agente citotóxico", en el contexto de la presente memoria descriptiva,
 40 se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función celular y/o causa la destrucción

5 celular. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} y los isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

10 Modos de realización de la invención

La invención de la presente memoria descriptiva proporciona los métodos para la purificación de un anticuerpo a partir de una composición (*por ejemplo*, una solución acuosa) que comprenden el anticuerpo y uno o más contaminantes. Generalmente, la composición es la que resulta de la producción recombinante del anticuerpo, pero que
15 puede ser la resultante de la producción de anticuerpo por la síntesis de péptidos (u otros medios sintéticos) o se puede purificar al anticuerpo a partir de una fuente original del anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo se une al antígeno CD20 humano, como rituximab, o se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), como bevacizumab.

20 *Producción de anticuerpos recombinantes*

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación subsiguiente (amplificación del ADN) o para expresión. Se aísla el ADN que codifica el anticuerpo y se secuencía utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas
25 capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo). Existen muchos vectores disponibles. Los componentes del vector suelen incluir, entre otros, uno o más de los elementos siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción (por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.534.615, específicamente incorporada como referencia en la
30 presente memoria descriptiva).

Las células huésped adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva son células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Las procariotas adecuadas para este fin incluyen eubacterias, como organismos
35 grampositivos o gramnegativos, por ejemplo, enterobacterias como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacillus* como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P dado a conocer en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*
40 como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación preferido de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque otras cepas como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC

5 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son también adecuadas. Estos ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitante.

Además de los microbios procarióticos, los microbios eucarióticos como los hongos filamentosos o las levaduras, también son aptos como huéspedes para la expresión o clonación de los vectores de codificación del anticuerpo. *Saccharomyces cerevisiae*, o la
10 levadura habitual del pan, es la que más se utiliza entre los microorganismos huésped eucarióticos inferiores. No obstante, se encuentran disponibles otros géneros, especies y cepas de utilidad en la presente memoria descriptiva, como por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *Kluyveromyces*, tales como *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii*
15 (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (patente europea 402,226); *Pichia pastoris* (patente europea 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (patente europea 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

20 Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado se derivan de organismos pluricelulares. Algunos ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de insectos y plantas. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y las correspondientes células huésped permisivas de insectos procedentes de huéspedes como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*.
25 Están disponibles diversas cepas de virus para transfección, por ejemplo, la variante L-1 del NPV *Autographa californica* y la cepa Bm-5 del NPV *Bombyx mori* y estos virus se pueden usar como el virus en la presente memoria descriptiva, de conformidad con la presente invención, en concreto para la transfección de las células de *Spodoptera frugiperda*.
30 Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también pueden utilizarse como huéspedes.

No obstante, el mayor interés se ha centrado en las células de vertebrados, y la propagación de éstas en cultivos (histocultivo) se ha convertido en un procedimiento habitual. Ejemplos de líneas celulares huésped útiles de mamíferos incluyen, entre otras,
35 células CV1 de riñón del mono transformadas por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); las células de riñón embrionario humano (293 ó 293 células subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de crías de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células sertoli de ratón
40 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células

5 de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células caninas de riñón (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células humanas de pulmón (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y células de
10 hepatoma humano (Hep G2). Con frecuencia, se prefieren las células CHO para la expresión de anticuerpos y se pueden utilizar ventajosamente para producir anticuerpos purificados de acuerdo con la presente invención.

Las células anfitrión se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios
15 nutrientes convencionales modificados como sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo de esta invención se pueden cultivar en diversos medios. Medios comercialmente disponibles como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Dulbecco's
20 Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son aptos para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes y col., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de EE.UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 ó 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re. 30.985 se pueden utilizar como medios de
25 cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar cuando sea necesario con hormonas y otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), soluciones tampón (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco garamicina; GENTAMICINA™), elementos traza
30 (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes en las concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Se puede incluir también cualquier otro suplemento necesario, en concentraciones adecuadas, conocidos por los expertos en la materia. Las condiciones del cultivo, como la temperatura o el pH entre otras, son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada
35 para expresión y serán evidentes para los expertos en la materia.

Cuando se usen técnicas recombinantes, se puede producir el anticuerpo a nivel intracelular, en el espacio periplasmático, o secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como un primer paso, los residuos de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados (*por ejemplo*, resultantes de
40 homogenización), se pueden eliminar, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltrado. Cuando el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de dichos

5 sistemas de expresión se pueden concentrar utilizando un filtro para concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltrado Amicon o Millipore Pellicon.

10 *El método de cromatografía de intercambio catiónico de la invención*

En la forma de realización preferente de la invención en la presente memoria descriptiva, la composición a ser realizada para el método de purificación es un anticuerpo producido mediante recombinación, preferentemente un anticuerpo intacto, expresado por un cultivo celular huésped recombinante de ovario de hámster chino (CHO).

15 Opcionalmente, la composición se ha sometido a por lo menos un paso de purificación antes de la cromatografía de intercambio catiónico. La composición contiene el anticuerpo de interés y uno o más contaminantes, como proteínas ováricas del hámster chino (CHOP); proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del anticuerpo deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante viral; componente del
20 medio de cultivo celular (*por ejemplo*, garamicina; GENTAMICINA®), etc.

Los ejemplos de los procedimientos de purificación adicionales que se pueden realizar antes, durante o después del método de cromatografía de intercambio catiónico incluyen fraccionamiento en cromatografía de interacción hidrofóbica (*por ejemplo*, sobre PHENYL-SEPHAROSE™), precipitación de etanol, enfoque isoelectrico, HPLC de fase
25 reversa, cromatografía sobre sílica, cromatografía sobre HEPARIN SEPHAROSE™, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico adicional, intercambio iónico de forma mixta, cromatoenfoco, SDS-PAGE, precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía inducida por carga hidrofóbica y cromatografía por afinidad (*por ejemplo*, utilizando
30 proteína A, proteína G, un anticuerpo, o sustrato específico, sustrato, ligando o antígeno como el reactivo de captura).

Según la presente invención, el esquema de la purificación de intercambio catiónico típicamente incluye los siguientes pasos efectuados de forma secuencial: (1) equilibrio del material de intercambio catiónico; (2) carga de la composición que será purificada en el
35 material de intercambio catiónico, (3) un paso de primer lavado; (4) un paso de segundo lavado y (5) elución del anticuerpo de interés.

Se puede mejorar de forma significativa la eficacia de la purificación al incluir al menos dos pasos de lavado en el esquema de purificación de intercambio catiónico, por lo menos el primero del cual es realizado a pH elevado (alrededor de pH 6,8 o superior). En
40 este caso particular, efectuar el primer paso de lavado utilizando una solución tampón de lavado con un pH en el rango de alrededor de 6,8 a 9,0 (*por ejemplo*, de alrededor de 7,0 a

5 8,0), como por ejemplo, alrededor de pH 7,8 o alrededor de pH 7,0, los contaminantes, como se describe anteriormente, se eliminan más eficientemente que utilizando un rango convencional menor de pH, de alrededor de 5,0 a 5,5. Como resultado, el contenido de la proteína celular del huésped de la composición, que comprende el anticuerpo eluido del material de intercambio catiónico, es típicamente menor de alrededor de 200 ppm, que se
10 encuentra por debajo del nivel de aproximadamente 500 ppm alcanzado utilizando un paso de lavado a un pH de alrededor de 5 a 5,5.

En la forma de realización preferente de la invención, el material de intercambio catiónico comprende un flujo cruzado por partículas de poli(estireno-divinilbenceno) (fase sólida) revestidas con un polímero polihidroxilado que funciona con grupos de
15 sulfopropilo, por ejemplo, columna POROS 50 HS® disponible en Applied Biosystems.

Usualmente, una solución tampón de equilibrio se pasa sobre o a través del material de intercambio catiónico antes de cargar la composición que comprende el anticuerpo de interés y uno o más contaminantes sobre el material. En la forma de realización preferente de esta invención, la solución tampón de equilibrio tiene un pH de
20 alrededor de 5,0 a 6,0, por ejemplo, alrededor de pH 5,5. Una solución tampón de equilibrio ejemplar consta de 19mM de MES, 60mM NaCl, pH 5,5. Otra solución tampón de equilibrio ejemplar consta de 23 mM de MES, 60 mM de NaCl, pH 5,5.

Seguidamente al equilibrio, se carga sobre el material de intercambio catiónico, una solución acuosa que consta del anticuerpo de interés y uno o más contaminantes.
25 Opcionalmente, el pH de la carga se encuentra en el rango de alrededor de 4,0 a 6,0, por ejemplo, alrededor de pH 5,0 o alrededor de pH 5,5. En una forma de realización preferente, se carga un producto condicionado proveniente de un paso de purificación previo. En una forma de realización, se carga a pH 5,0 sobre el material de intercambio catiónico un pool (conjunto) de proteína A de una cromatografía de purificación previa de
30 proteína A. En otra forma de realización, se carga a pH 5,5 sobre el material de intercambio catiónico un pool de Q-SEPHAROSE® condicionado. Las densidades de carga ejemplares se encuentran en el rango de alrededor de 10 a 100 g/L de resina, preferentemente de alrededor de 10 a 60g/L de resina, con mayor preferencia de alrededor de 15 a 45 g/L de resina. Como resultado de este paso de carga, el anticuerpo de interés se
35 une al material de intercambio catiónico.

Después de cargar, se lava el material de intercambio catiónico con un primer paso de lavado con una solución tampón de primer lavado. Durante el proceso de lavado, la solución tampón de lavado se pasa sobre el material de intercambio catiónico. La composición de la solución tampón de lavado se escoge usualmente para eluir la mayor
40 cantidad de contaminantes posible de la resina sin eluir una cantidad sustancial del anticuerpo de interés. El pH de la solución tampón del primer lavado es generalmente

5 mayor que el de la solución tampón de equilibrio y/o de la composición cargada, por ejemplo, alrededor de 2 a 3 unidades pH mayor. Preferiblemente, el pH de la solución tampón del primer lavado se encuentra en el rango de alrededor de 6,8 a 9,0, de preferencia de alrededor de 6,8 a 8,0, por ejemplo, alrededor de pH 7,8 o alrededor de pH 7,0. Ejemplos de soluciones tampón que amortiguan en este rango de pH incluyen, pero no se
10 limitan a HEPES, MES, acetato de sodio, TRIS/HCl, hidrocloreuro de trietanolamina/NaOH, Bicine/HCl, Tricine/HCl, etc. La solución tampón preferente para primer lavado comprende o consiste en: (1) 25 mM de HEPES, pH 7,8 o (2) 25 mM de MOPS, pH 7,0.

A este respecto, la presente invención proporciona una composición que
15 comprende un anticuerpo CD20 quimérico recombinante, tal como rituximab, en 25 mM de HEPES, pH 7,8. La invención también proporciona un anticuerpo VEGF humanizado recombinante, como bevacizumab, en 25 mM de MOPS, pH 7,0. Estas composiciones son útiles, entre otras cosas, como composiciones intermedias utilizadas en la purificación de estos productos.

20 La invención de la presente memoria descriptiva conlleva por lo menos un paso adicional de lavado, o un segundo paso de lavado utilizando una solución tampón de segundo lavado. Preferiblemente, el pH de la solución tampón del segundo lavado es menor que el pH de la solución tampón del primer lavado, por ejemplo, de alrededor de 2 a 3 unidades de pH menor. Así, por ejemplo, el pH de la solución tampón del segundo
25 lavado puede estar en el rango de alrededor de pH 5,0 a pH 6,0. Preferentemente, el pH de la solución tampón del segundo lavado es de alrededor de 5,5. Ejemplos de soluciones tampón en los que la solución tampón se encuentra en este rango de pH incluyen, pero no se limitan a, MES, ácido acético/acetato de sodio o NaOH, $\text{NaH}_2\text{PO}_3/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, Bis.Tris/HCl. MES a pH 5,5 es la solución tampón preferida para el segundo lavado. En
30 una forma de realización, la solución tampón del segundo lavado comprende o consiste de: 19mM MES, 10mM NaCl, pH 5,5. En otra forma de realización, la solución tampón del segundo lavado comprende o consiste de 23mM MES, 10mM NaCl, pH 5,5.

Aún cuando se pueden emplear pasos de lavado adicionales, se hace preferible sólo un primer y segundo paso de lavado, antes de eluir el anticuerpo deseado. Durante el
35 primer y/o segundo paso de lavado, se eliminan los contaminantes, tal como aquellos descritos anteriormente, del material de intercambio catiónico. Preferentemente, el primer paso de lavado elimina la mayoría de contaminantes.

Después del o los paso(s) de lavado mencionados anteriormente, se eluye el anticuerpo deseado del material de intercambio catiónico. Se puede lograr la elución del
40 anticuerpo al aumentar la conductividad o fuerza iónica. Convenientemente, la conductividad de la solución tampón de elución es mayor que alrededor de 10 mS/cm. Se

5 puede alcanzar un aumento en la conductividad al incluir una concentración elevada de sal en la solución tampón de elución. Las sales ejemplares para este propósito incluyen, sin limitación, acetato de sodio, cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de potasio (KCl). En una forma de realización, la solución tampón de elución comprende de alrededor de 100 a 300mM de NaCl. Generalmente, la solución tampón de elución tendrá aproximadamente el mismo pH que la solución tampón del segundo lavado. Una solución tampón de elución preferida comprende: 19mM MES, 160mM NaCl, pH 5,5. Otra solución tampón de elución preferida comprende: 23mM MES, 175mM NaCl, pH 5,5. La elución involucra preferiblemente el paso de elución (al contrario de la elución por gradiente).

15 Mientras que el paso de elución se sigue de forma opcional por un paso de regeneración, éste no es necesario de acuerdo a la forma de realización preferente de la invención.

Mientras que se contemplan pasos adicionales, el método de purificación de intercambio catiónico de la presente memoria descriptiva consiste únicamente de los pasos siguientes: equilibrio (*por ejemplo*, uso de solución tampón de equilibrio con pH de alrededor de 5,5), carga de una composición que comprende anticuerpo y contaminante(s) (*por ejemplo*, donde el pH de la composición cargada es de alrededor de 5,0 o de alrededor de 5,5), primer paso de lavado para la elución de contaminantes (*por ejemplo*, uso de la solución tampón del primer lavado a pH de alrededor de 7,8 o solución tampón de primer lavado a pH de alrededor de 7,0), segundo paso de lavado (*por ejemplo*, uso de solución tampón de segundo lavado a pH de alrededor de 5,5) y elución (*por ejemplo*, uso de solución tampón de elución a pH de alrededor de 5,5 y conductividad aumentada relativa a cada uno de los pasos anteriores para la elución del anticuerpo).

Si es necesario, se podría someter a la preparación del anticuerpo obtenido de acuerdo al método de la cromatografía de intercambio catiónico de la presente memoria descriptiva, a pasos de purificación adicionales. Anteriormente, se han descrito los pasos de purificación adicionales ejemplares.

Opcionalmente, según se desea, se conjuga el anticuerpo con una o más moléculas. Por ejemplo, la molécula heteróloga, puede aumentar la vida media sérica del anticuerpo (*por ejemplo*, polietilenglicol, PEG), o puede ser un marcador (*por ejemplo*, una enzima, marcador fluorescente y/o radionúclido), o una molécula citotóxica (*por ejemplo*, una toxina, fármaco quimioterapéutico, o isótopo radioactivo, etc.).

Se puede preparar una formulación farmacéutica que comprenda el anticuerpo, opcionalmente conjugado con una molécula heteróloga, al mezclar el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales que sean farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los

5 vehículos, excipientes o estabilizadores “farmacéuticamente aceptables” no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones tampón como el fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y metionina; conservantes (como por ejemplo, el cloruro de octadecildimetilbenzilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de
10 benzetonio; fenol; alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos como por ejemplo metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como por ejemplo, polivinilpirrolidona; aminoácidos, como por ejemplo, la glicina, glutamina, asparragina,
15 histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, como por ejemplo, EDTA; azúcares como por ejemplo sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales como por ejemplo sodio; complejos metálicos (*por ejemplo*, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, como por ejemplo, TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol
20 (PEG).

Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo,
25 liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Osol, A., Ed., (1980).

La formulación utilizada para administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se logra mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

30 Se pueden elaborar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo variante, cuyas matrices están en forma de elementos moldeados, *por ejemplo*, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación controlada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de EE.UU. n.º
35 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido glicólico-ácido láctico como por ejemplo LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

40 El anticuerpo purificado tal como se revela en la presente memoria descriptiva o la composición que comprende el anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable se

5 utiliza después para diversos usos de estos anticuerpos y composiciones, estos usos pueden ser diagnósticos, terapéuticos u otros. Por ejemplo, se puede utilizar el anticuerpo para tratar un trastorno en un mamífero al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo al mamífero. En el caso de un anticuerpo CD20 como rituximab se puede utilizar para reducir las células B, tratamiento de linfoma (por ejemplo linfoma no
10 Hodgkin, LNH), o leucemia (por ejemplo leucemia linfocítica crónica, LLC) así como enfermedades auto inmunes como artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (MS), lupus, etc. Para un anticuerpo que se une a VEGF, como es bevacizumab, se puede utilizar para inhibir angiogénesis, tratar cáncer y degeneración macular, etc.

A continuación, se ofrecen ejemplos a título ilustrativo únicamente. Las
15 divulgaciones de todas las citas de las especificaciones del producto están expresamente incorporadas en la presente memoria descriptiva por referencia.

EJEMPLO 1: PURIFICACIÓN DE UN ANTICUERPO CD20

20 El presente ejemplo describe un proceso mejorado de cromatografía de intercambio catiónico para la purificación de un anticuerpo CD20, rituximab. Se utiliza rituximab para la terapia de LNH, LLC, AR, EM, etc. La estructura de la molécula de rituximab se divulga en 5.736.137, Anderson *y col.*, (expresamente incorporada en la presente memoria descriptiva como referencia) así como en las figuras 1A-1B de la presente memoria
25 descriptiva. Rituximab se encuentra comercialmente disponible por medio de Genentech, Inc.

La cromatografía de intercambio catiónico se utiliza para reducir aún más los niveles de CHOP, ADN, proteína A lixiviada, garamicina (GENTAMICINA®), agregados de rituximab y virus potenciales. Rituximab se une a la columna bajo las condiciones de
30 carga. Luego se lava la columna, se eluye, regenera/sanitiza y almacena hasta la próxima utilización. Se pueden utilizar ciclos múltiples para procesar el lote completo del pool (conjunto) de afinidad. Se puede mantener al pool de intercambio catiónico a temperatura ambiente hasta 30°C durante 3 días o a 5°C hasta por 7 días.

La resina de intercambio catiónico (POROS 50 HS®, Applied Biosystems) se
35 encuentra empacada en una columna hasta una altura de 17-33 cm. Antes de que se cargue el pool de afinidad, se purga la columna de intercambio catiónico de la solución de almacenamiento con la solución tampón de equilibrio. Después del equilibrio, se carga el pool de afinidad en la columna. Bajo estas condiciones, el producto se une a la columna. Luego, se lava la columna con la solución tampón del lavado 1, seguido de la solución

5 tampón del lavado 2. Se utiliza una solución tampón de elución de fuerza iónica elevada para eluir al rituximab de la columna.

En la siguiente tabla se muestra una comparación de las condiciones para el proceso de la presente invención en comparación con el proceso original (control).

10 **Tabla 1: Comparación de las soluciones tampón para los procesos de cromatografía de intercambio catiónico para rituximab**

Fase	Composición de la solución tampón (proceso original)	Composición de la solución tampón (proceso ejemplificado)
Pre-equilibrio	20mM MES, 500mM NaCl, pH 5,50.	Ninguno
Equilibrio	20mM MES, 60mM NaCl, pH 5,50.	19mM MES, 60mM NaCl, pH 5,50.
Carga	Pool de proteína A condicionada, pH 5,00, densidad de carga ≤ 50g/L resina	Pool de proteína A condicionada, pH 5,00, densidad de carga ≤ 50g/L resina
Lavado 1	20mM MES, 60mM NaCl, pH 5,50.	25mM HEPES, pH 7,80
Lavado 2	Ninguno	19mM MES, 10mM NaCl, pH 5,50.
Elución	20mM MES, 160mM NaCl, pH 5,50.	19mM MES, 160mM NaCl, pH 5,50.
Regeneración	20mM MES, 500mM NaCl, pH 5,50.	Ninguno
Saneamiento	0,5 N NaOH	0,5 N NaOH
Almacenamiento	0,1 N NaOH	0,1 N NaOH

En la siguiente tabla se muestra el pH , la conductividad y los rangos de molaridad deseables para la carga y las soluciones tampón en el proceso de rituximab.

15 **Tabla 2: pH, conductividad y rangos de molaridad preferidos para el proceso de rituximab**

Solución tampón	Composición de la solución tampón	pH objetivo	Rango de molaridad de la solución tampón preferido	Rango preferido de pH de la solución tampón	Rangos de conductividad permitidos para las soluciones tampón
Equilibrio	19mM MES, 60mM NaCl	5,5	14 – 23mM MES 50 – 70 mM NaCl	5,0 – 6,0	5,0 – 7,2 mS/cm
Carga	Pool de proteína A condicionado	5,0	NA	4,5 – 5,5	2,5 – 5,5 mS/cm
Lavado 1	25mM HEPES	7,8	15-35 mM HEPES	7,5 – 8,1	0,5 – 1,5 mS/cm
Lavado 2	19mM MES 10mM NaCl	5,5	14 – 23mM MES 5 – 15 mM NaCl	5,0 – 6,0	0,6 – 2,2 mS/cm
Elución	19 mM MES 160 mM NaCl	5,5	14 – 23 mM MES 140 -180 mM NaCl	5,3 – 5,7	13,4 – 17,2 mS/cm
Saneamiento	0.5N NaOH	NA	NA	NA	NA
Almacenamiento	0,1N NaOH	NA	NA	NA	NA

5 * Los valores de conductividad se midieron con compensación de temperatura con base en una temperatura de 20°C y un valor alfa de 1,77.

El proceso ejemplificado para la purificación de rituximab aumentó la fuerza de la eliminación de la proteína de la celular del huésped al permitir una mayor eliminación de las proteínas celulares del huésped en las fases de lavado, que dieron como resultado

10 niveles menores de proteínas celulares del huésped en el pool del producto (pool de elución) y facilitaron la eliminación de impurezas en el paso del flujo inferior subsiguiente. La figura 3 ilustra las ventajas del presente proceso en términos de la eliminación de las proteínas celulares del huésped.

EJEMPLO 2: PURIFICACIÓN DE UN ANTICUERPO VEGF

15 Este ejemplo describe un proceso de cromatografía de intercambio catiónico para la purificación de un anticuerpo del factor de crecimiento endotelial vascular humanizado recombinante (rhuMab VEGF), bevacizumab. La estructura de la molécula de bevacizumab se revela en la patente de EE.UU. 7.169.901, Presta y col., expresamente incorporada en la presente memoria descriptiva como referencia. Véanse también las

20 figuras 2A-2B de la presente memoria descriptiva. Bevacizumab se encuentra comercialmente disponible por medio de Genentech, Inc.

5 El presente ejemplo resume los estudios de desarrollo elaborados en el paso de intercambio catiónico para un proceso mejorado de purificación de bevacizumab. En estos estudios se evaluaron tres resinas de intercambio catiónico: CM SEPHAROSE FAST FLOW®, SP SEPHAROSE FAST FLOW® y POROS 50HS®. Los procesos de purificación de intercambio catiónico utilizando estas tres resinas se evaluaron con respecto a: desempeño del proceso (eliminación de impurezas, eliminación de retrovirus y rendimiento del paso), calidad del producto, fuerza del proceso y adecuación del mismo a todos los sitios actuales de fabricación. Basados en los datos generados en estos estudios, POROS 50HS® demostró un desempeño superior del proceso y fuerza y se seleccionó como la resina de intercambio catiónico para el proceso de purificación mejorado.

15 La cromatografía de intercambio catiónico es el paso final de cromatografía en el proceso de purificación. Es útil eliminar los componentes de los medios de cultivo celulares (garamicina), impurezas derivadas de la célula huésped (CHOP y ADN) y las formas agregadas de bevacizumab. Esto también funciona como un paso de eliminación viral.

20 Se opera la columna en un modo de unión y elución y se hace a temperatura ambiente. La columna utiliza una resina de intercambio catiónico (POROS 50HS®). La resina consiste de un soporte poroso de poliestireno-divinilbenceno acoplado con un grupo funcional cargado negativamente. Se retira la columna de almacenamiento al lavarla con la solución tampón de equilibrio. El pool viral filtrado se diluirá con 0,3 volúmenes de agua para inyección (WFI) para cumplir con el límite de conductividad de $\leq 5,5$ mS/cm. Luego, el pool viral filtrado se carga en la columna equilibrada. El producto se une a la resina. Después de cargar, se lava la columna con una solución tampón de pH elevado para lavar el material de carga a lo largo de la columna y eliminar las impurezas de CHOP. Seguidamente, la columna se lava con una solución tampón baja en sal para bajar el pH y preparar la columna para elución. Se eluye el producto utilizando un paso de elución de solución tampón elevada en sal con un máximo de 7 volúmenes de columna. Después de la elución, la columna y el deslizador se limpian con solución de saneamiento (0,5 N NaOH) antes de almacenar en la solución de almacenamiento (0,1 N NaOH) hasta su próximo uso.

35 La siguiente tabla muestra una descripción de las condiciones del proceso de bevacizumab de la invención en la presente memoria descriptiva.

Tabla 3 – Proceso de bevacizumab

Fase	Solución tampón / Solución	Parámetro del	Velocidad
------	----------------------------	---------------	-----------

		proceso	de flujo (cm/hr)
Altura de la Capa (cm)	N/A	30	N/A
Equilibrio	23mM MES / 60mM NaCl pH 5,5 , cond. 6,9 mS/cm	4 CV	100
Carga	Pool viral filtrado (VF) condicionado pH 5,5 ± 0.2, cond. ≤ 5,5 mS/cm	15 – 45 g bevacizumab / L de resina	100
Lavado 1	25mM MOPS, pH 7,0	3 CV	100
Lavado 2	23mM MES / 10mM NaCl pH 5,5, cond.1,5 mS/cm	3 CV	100
Elución	23mM MES / 175 mM NaCl pH 5,5, cond. 18 mS/cm	7 CV	100
	Inicio del pool	OD ₂₈₀ ≥ 0,5	N/A
	Finalización del pool	OD ₂₈₀ ≤ 1,0	N/A
Saneamiento	0.5N NaOH	3 - 6 CV	50 - 100
Almacenamiento	0,1N NaOH	3 - 6 CV	50 - 100

5

En la siguiente tabla se muestra el pH, la conductividad y los rangos de molaridad deseables para la carga y las soluciones tampón en el proceso de bevacizumab.

10 **Tabla 4: pH, conductividad y rangos de molaridad preferidos para el proceso de bevacizumab**

	Solución tampón objetivo	Rango de pH objetivo	Rango de conductividad objetivo	Rango preferido de molaridad de la solución tampón	Rango preferido de pH de la solución tampón
Equilibrio	23mM MES, 60mM NaCl	5,4 -5,6	6,1 -7,7mS/cm	13-33mM MES 50-70mM NaCl	5,1-5,9
Carga	Pool VF pool	5,3 - 5,7	≤ 5,5 mS/cm	≤ 6,5mS/cm	5,2-5,8

	diluido con agua para inyección (WFI)				
Lavado 1	25mM MOPS	6,9-7,1	0,2-1,2 mS/cm	15-35mM MOPs	6,6-7,4
Lavado 2	23mM MES 10mM NaCl	5,4-5,6	1,2-1,8 mS/cm	13-33mM MES 5-20mM NaCl	5,1-5,9
Elución	23mM MES 175mM NaCl	5,45-5,55	17,5-18,5 mS/cm	13-33mM MES 160-190mM NaCl	5,4-5,6
Saneamiento	0,5N NaOH	NA	50-60mS/cm (dilución 1:1)	0,5N NaCl	NA
Almacenamiento	0,1N NaOH	NA	17-27mS/cm	0,1N NaOH	NA

5

Se encontró que el proceso presente fue superior al proceso original de bevacizumab en el que se utilizó un primer lavado con una solución tampón a pH 5,5. En el nuevo proceso en la presente memoria descriptiva se lograron pools con niveles menores de CHOP, se logró un rendimiento más elevado en el paso y fue en general un

10 proceso más robusto para hacer la corrida para la producción.

5 LAS REIVINDICACIONES SON:

1. Un método para la purificación de un anticuerpo a partir de una composición que comprende el anticuerpo y al menos un contaminante, y el método consta de los pasos secuenciales de:
 - 10 (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico, donde la composición se encuentra en un primer pH;
 - (b) lavar el material de intercambio catiónico con una primera solución tampón a un pH mayor que el de la composición (a), donde el pH de la primera solución tampón de lavado es de alrededor de 6,8 hasta alrededor de 9,0;
 - 15 (c) lavar el material de intercambio catiónico con una segunda solución tampón de lavado a un pH que es menor que la solución tampón del primer lavado y
 - (d) eluir el anticuerpo del material de intercambio catiónico con la solución tampón de elución con una conductividad que es sustancialmente mayor que aquella de la solución tampón del segundo lavado.
 - 20
2. El método de la reivindicación 1 donde el pH de la solución tampón del segundo lavado y el pH de la solución tampón de elución son los mismos aproximadamente.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el anticuerpo se une a CD20 humano.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el anticuerpo se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) humano.
- 30
5. El método de la reivindicación 1 donde el pH de la composición en (a) es de alrededor de 4,0 a 6,0, el pH de la solución tampón del primer lavado es de alrededor de 6,8 a 8,0, el pH de la solución tampón del segundo lavado es de alrededor de 5,0 a 6,0 y el pH de la solución tampón de elución es de alrededor de 5,0 a 6,0.
- 35
6. El método de la reivindicación 1 donde la conductividad de la solución tampón de elución es de alrededor de 10mS/cm a 100mS/cm.
7. El método de la reivindicación 1 donde la solución tampón de elución
- 40 comprende alrededor de 100 a 300mM de NaCl.

5 8. El método de la reivindicación 1 donde el material de intercambio catiónico comprende un flujo cruzado por partículas de poli(estireno-divinilbenceno) revestidas con un polímero de polihidroxilado que funciona con grupos de sulfopropilo.

10 9. El método de reivindicación 1 donde el contaminante se selecciona del grupo que consiste de proteínas de ovario de hámster chino (CHOP), proteína A lixiviada, ADN, anticuerpo agregado y componentes de medios de cultivo celular, garamicina y contaminantes virales.

15 10. El método de la reivindicación 1 comprende además el sometimiento de la composición que comprende al anticuerpo a uno o más pasos de purificación antes, durante o después de los pasos (a) a (d) para obtener una preparación homogénea del anticuerpo.

20 11. El método de reivindicación 10 que además comprende la conjugación del anticuerpo purificado con una molécula heteróloga.

25 12. El método de reivindicación 10 u 11 que además comprenden la preparación de una composición farmacéutica al combinar la preparación homogénea del anticuerpo o anticuerpo conjugado con una vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 13. Un método para la purificación de un anticuerpo que se une a CD20 humano de una composición que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes seleccionados del grupo consistente de las proteínas ováricas de hámster chino (CHOP), proteína A lixiviada, ADN y anticuerpo CD20 agregado, del cual el método comprende los siguientes pasos secuenciales:

- (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico en donde la composición está a un pH de alrededor de 4,0 a 6,0;
- (b) lavar el material de intercambio catiónico con una solución tampón de primer lavado a un pH de alrededor de 6,8 a 9,0;
- 35 (b) lavar el material de intercambio catiónico con una solución tampón de segundo lavado a un pH de alrededor de 5,0 a 6,0 y
- (d) elución del anticuerpo del material de intercambio catiónico utilizando una solución tampón de elución con un pH de alrededor de 5,0 a 6,0 y una conductividad desde alrededor de 10mS/cm a 100mS/cm.

40 14. El método de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo es rituximab.

5

15. El método de la reivindicación 13 donde la solución tampón de elución comprende alrededor de 100 a 300mM de NaCl.

10 16. Un método para la purificación de un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de una composición que comprende el anticuerpo y uno o más contaminantes seleccionados del grupo consistente del componente de los medios de cultivo celular, gamicina, las proteínas ováricas de hámster chino (CHOP), ADN, contaminante viral y anticuerpo VEGF agregado, del cual el método comprende los siguientes pasos secuenciales:

15 (a) cargar la composición en un material de intercambio catiónico en donde la composición está a un pH de alrededor de 4,0 a 6,0;
(b) lavar el material de intercambio catiónico con una solución tampón de primer lavado a un pH desde alrededor de 6,8 a 8,0;
(b) lavar el material de intercambio catiónico con una solución tampón de segundo
20 lavado a un pH desde alrededor de 5,0 a 6,0 y
(d) elución del anticuerpo del material de intercambio catiónico utilizando una solución tampón de elución con un pH de alrededor de 5,0 hasta alrededor de 6,0 y una conductividad de alrededor de 10mS/cm a 100mS/cm.

25 17. El método de la reivindicación 16, en el que el anticuerpo es bevacizumab.

18. El método de la reivindicación 16 donde la solución tampón de elución comprende alrededor de 100 a 300mM NaCl.

30 19. Una composición que comprende rituximab en una solución tampón que comprende alrededor de 25mM HEPES a un pH de alrededor de 7,8.

20. Una composición que comprende bevacizumab en una solución tampón que contiene alrededor de 25mM MOPS a un pH de alrededor de 7,0.

35

5

PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIÓNICO

10

Resumen de la divulgación

Se describe un método para la purificación de anticuerpo por cromatografía de intercambio catiónico en el que el paso de lavado a pH elevado se utiliza para eliminar los contaminantes antes de eluir el anticuerpo deseado utilizando una solución tampón de elución con conductividad aumentada.

15

Figura 1A - Cadena pesada de rituximab

+1	FR1										10						15	
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser		
20		25					30					31	CDR1		35	36		
Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp
40			FR2		45					49		50	52		52A	53	54	
Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn
55	CDR2			60	65					66	FR3		70					
Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys
75		80					82	82A	82B	82C	83	85						
Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
90	94			95	CDR3					100	100A	100B	100C	100D	101	102	103	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly
105	FR4		110			113		114	120									
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro

Constante Gamma 1 humana

130	133	140																
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
150			154					156	157	162								
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
169	171	180					182											
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
190	200					203	205	210										
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
220			222					225	230					232	235			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
240			243		244	250												
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
260	270																	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr

Constante Gamma 1 humana - continuación

280		290					292											
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
295	296	299	300	310					314					317				
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
320			330															
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys

50

	340		350	355
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile				
357	360	361 363	370	
Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg			
378 381		390		
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro				
	400	402 405	408 410 413	420
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr				
		428 430 433	440	
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val				
	450		460	
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala				
	470		478	Aminoácido
n.° (Kabat)				
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys TER				

Figura 1B - Cadena ligera de rituximab

```

      +1      FR1      10
      Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser

      20      23      24      CDR1      27/ 29 30      34
Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His

      35      FR2      40      45      49 50      CDR2
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn

      55 56 57      60      FR3      65      70
Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

      75      80      85      88 89 90
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

      CDR3 95      97 98      100 FR4      105      107 108      110
Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val

      120
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

      Constante kappa humana

      130      140
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp

      150      160
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp

      170      180
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

      190      200
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

      210      214      Aminoácido n.º (Kabat)
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys TER

```

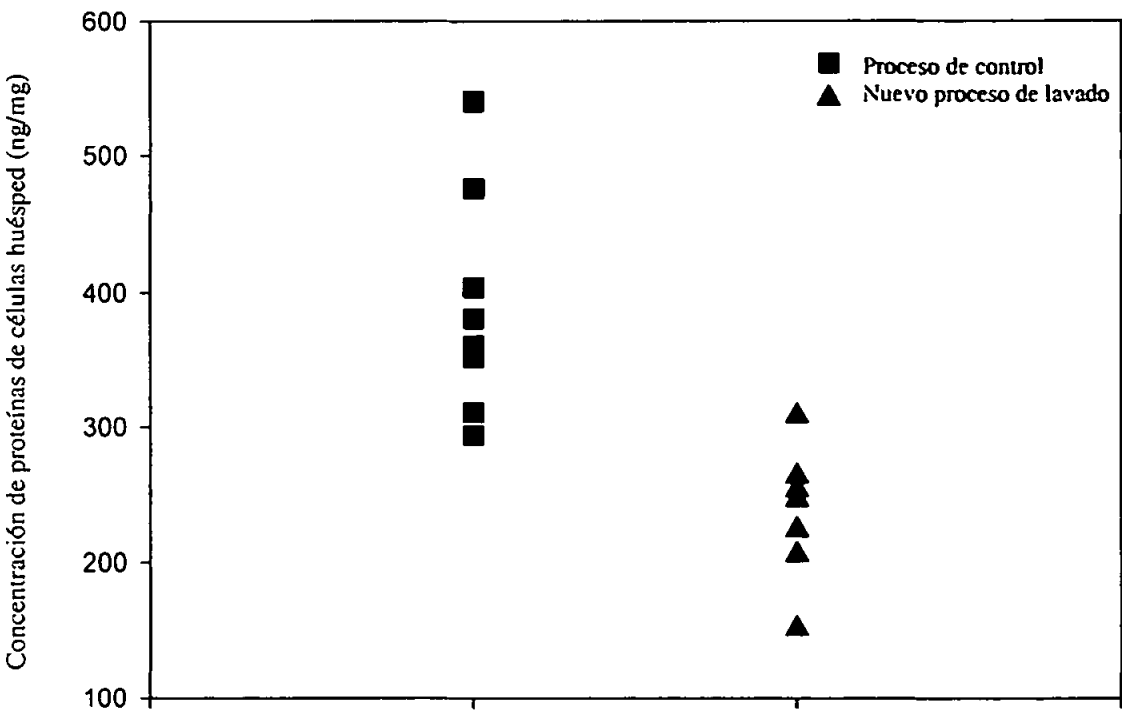
Figura 2A – Cadena pesada de bevacizumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGL
EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDT
AVYYCAKYPHYYGSSHWFYFDVWGQGTLLTVSS || ASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 2B – Cadena ligera de bevacizumab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVL
IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPW
TFGQGTKVEIKR || TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 3 – Procesos de eliminación de proteínas celulares del huésped para rituximab



/

Listado de secuencia

<110> GENENTECH, INC.
 Lebreton, Benedicte Andree
 O'Connor, Deborah Ann
 Safta, Aurelia
 Sharma, Mandakini

<120> PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIÓNICO

<130> P2280R1 WO

<150> US 60/983,825

<151> 2007-10-30

<160> 20

<210> 1

<211> 432

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia se sintetiza

<400> 1

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

55

Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
				260					265					270
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
				275					280					285
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
				290					295					300
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
				305					310					315
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				320					325					330
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
				335					340					345
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
				350					355					360
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
				365					370					375
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				380					385					390
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
				395					400					405
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
				410					415					420
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
				425					430					

<210> 2
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia se sintetiza

<400> 2
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30
Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
35 40 45
Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
65 70 75
Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
95 100 105
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
110 115 120
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125 130 135
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
140 145 150
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
155 160 165

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
170 175 180
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
185 190 195
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
200 205 210
Gly Glu Cys

<210> 3
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 3
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp
95 100 105
Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
110 115 120

Ala

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 4
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30
Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
35 40 45
Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
65 70 75
Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
95 100 105

57

Lys

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 5
Ser Tyr Asn Met His
5

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 6
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 7
Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
5 10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 8
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 9
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 10
Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
5

<210> 11
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> La secuencia se sintetiza

<400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Leu Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
 95 100 105
 Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 110 115 120
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 125 130 135
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 140 145 150
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 155 160 165
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 170 175 180
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 185 190 195
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 200 205 210
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 215 220 225
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 320 325 330
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 335 340 345

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
350 355 360
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
365 370 375
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
380 385 390
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
395 400 405
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
410 415 420
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
425 430 435
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
440 445 450
Pro Gly Lys

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30
Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210
Arg Gly Glu Cys

<210> 13
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Asp Tyr Tyr Leu Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
50 55 60
Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
95 100 105
Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
110 115 120
Val Ser Ser

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 14
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30
Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 15

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
5 10

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 16
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
1 5 10 15

Lys Arg

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 17
Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 18
Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
5 10

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 19
Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La secuencia se sintetiza

<400> 20
Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
5

AS: 97708
62



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

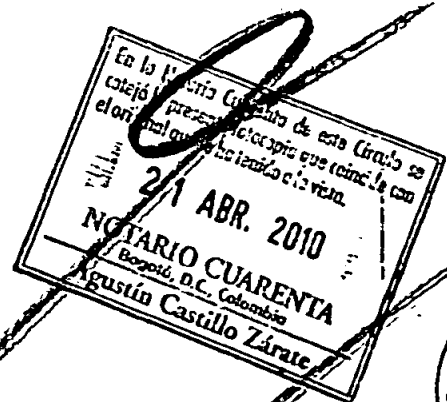
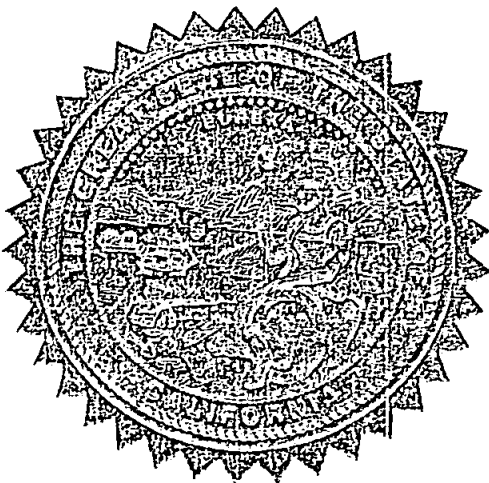
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by AIDA MICLAT GUIAM
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of AIDA MICLAT GUIAM, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 15th day of December, 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 267083
9. Seal/Stamp:

10. Signature



[Signature]

Secretary of State

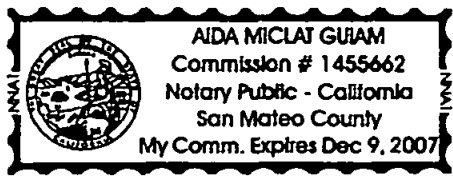
BY *[Signature]*

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California }
County of San Mateo } ss.
On December 6, 2005 before me, Aida Midaí Guian
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Timothy R. Schwartz
Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.
Aida Midaí Guian
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

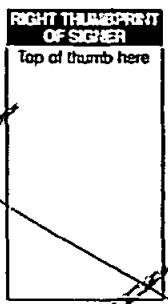
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
- ☐ Corporate Officer — Title(s): _____
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney-in-Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____



Brigard & Castro
BOGOTA - COLOMBIA

64

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseññas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in

South San Francisco, California 94080-4990
USA

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We), hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

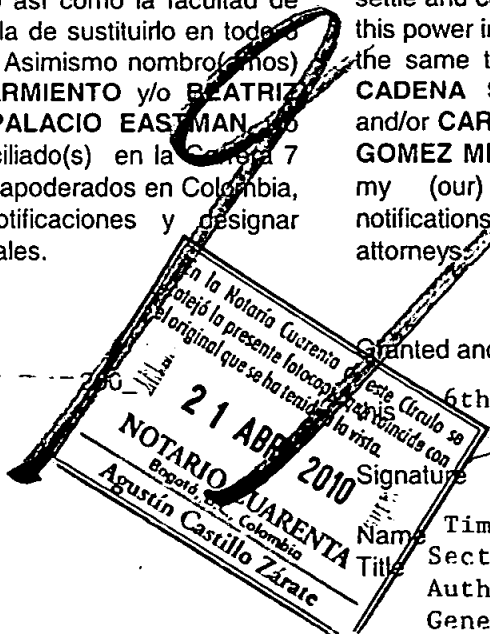
South San Francisco, California
USA

Granted and signed in

6th day of December 2005

Signature

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.



AUTHORIZATION

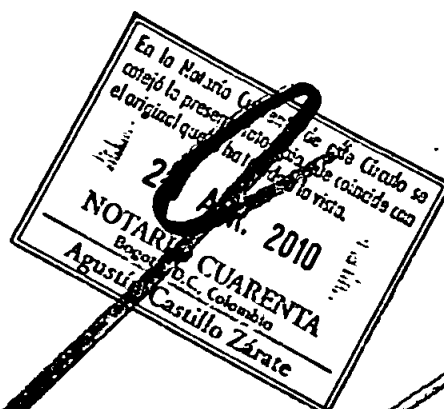
Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston
Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



66

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por Genentech, Inc. domiciliada en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

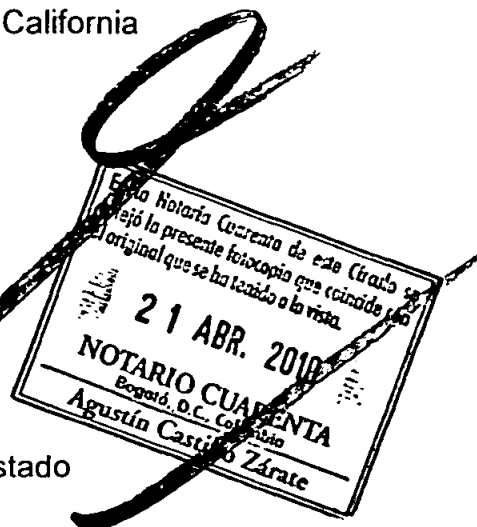
CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)

Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente
Thimoty R. Schwartz

- ☐ a quien conozco personalmente
- ☒ quien demostró ante mi en base a evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre esta suscrito en el instrumento y quien reconoció ante mi que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en el instrumento la persona o la entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

-----OPCIONAL-----

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

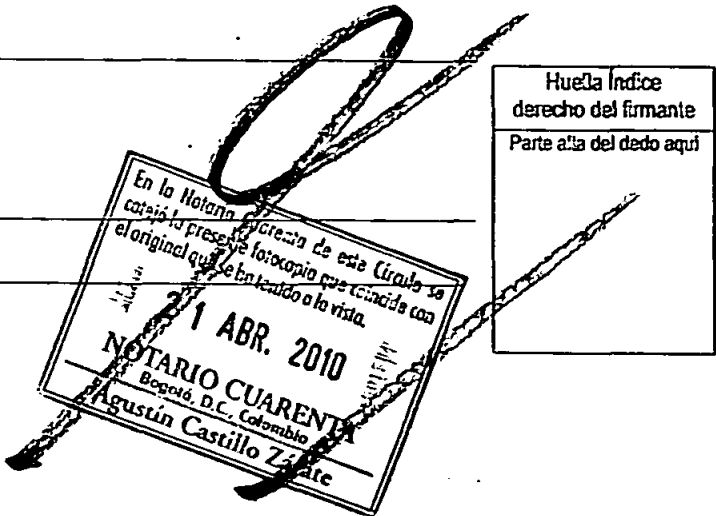
Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

- Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)
- Nombre del firmante: _____
- ☐ Individuo
- ☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
- ☐ Abogado de hecho
- ☐ Fideicomisario
- ☐ Guardián o conservador
- ☐ Otro: _____

El firmante representa: _____



AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002
Fechado

(Firma)
Sean A. Johnston
Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

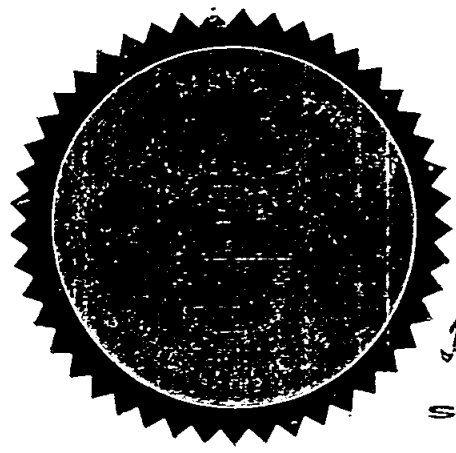
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

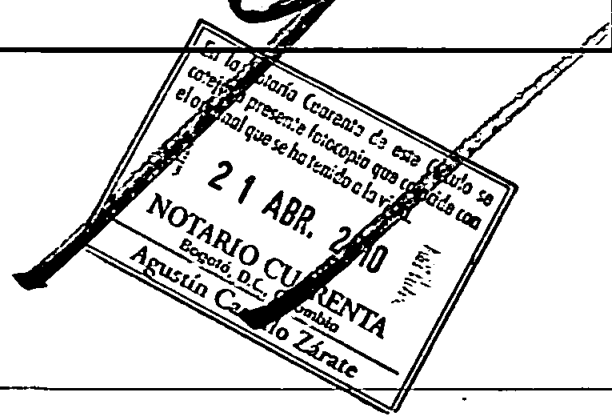
8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

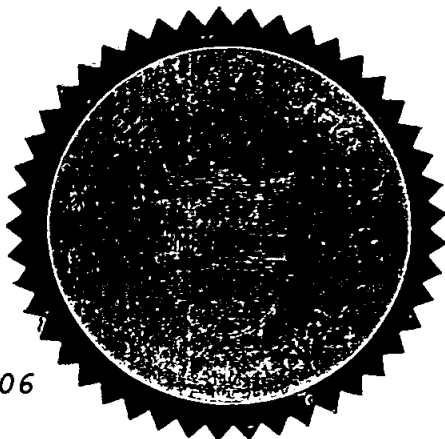


Delaware

PAGE 1

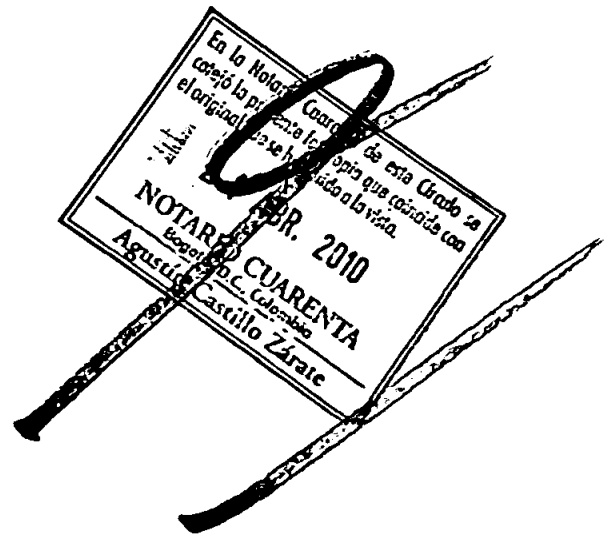
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

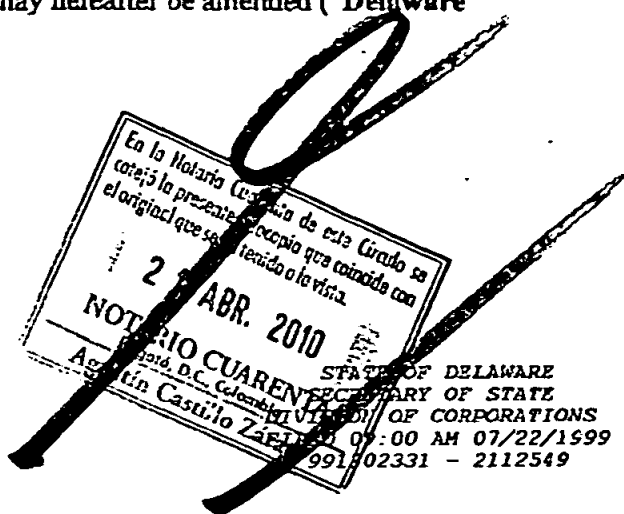
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").



ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

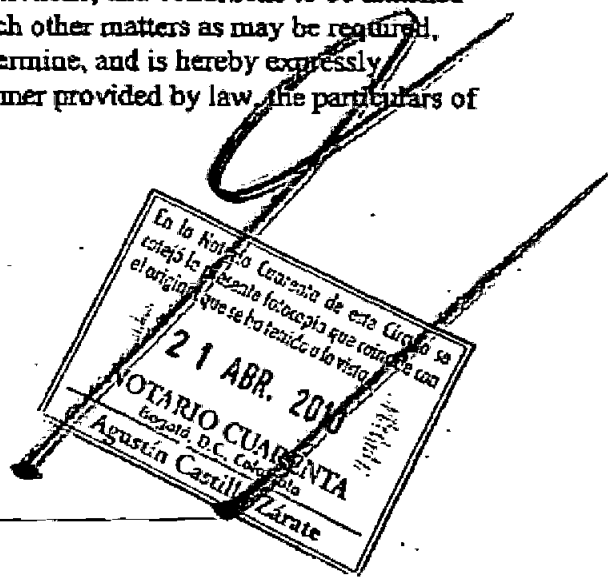
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

- (i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;
- (ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;
- (iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;
- (iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;
- (v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;
- (vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;
- (vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and
- (viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.

En la presente se ha
 otorgado el presente documento de esta Circulo se
 el original que se encuentra en la oficina de la Notaria
 2 ABR. 2010
 NOTARIO CUARENTA
 Bogotá, D.C. Colombia
 Agustín Castillo Zárate

ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

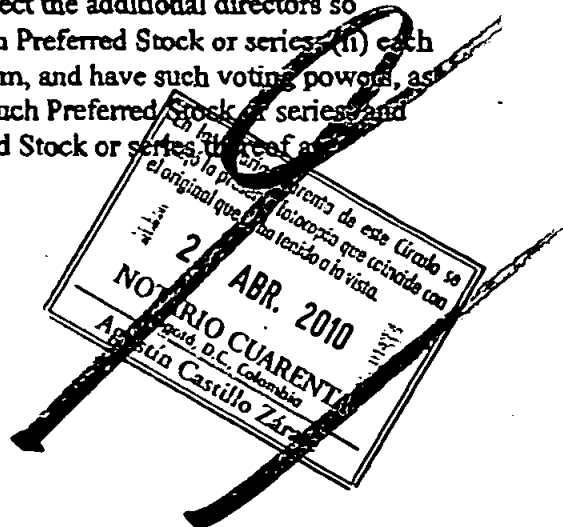
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

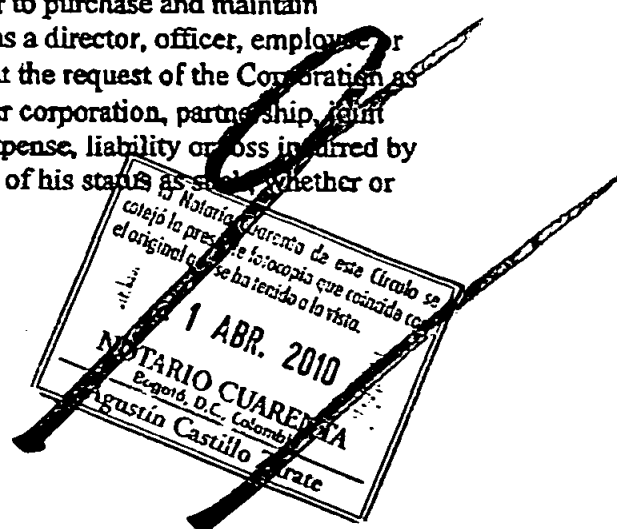
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

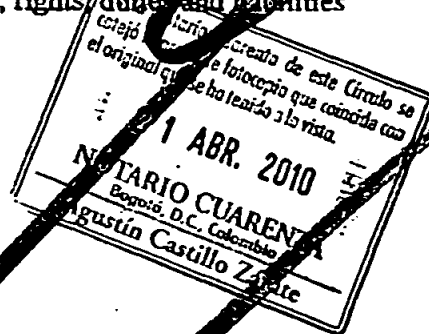
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

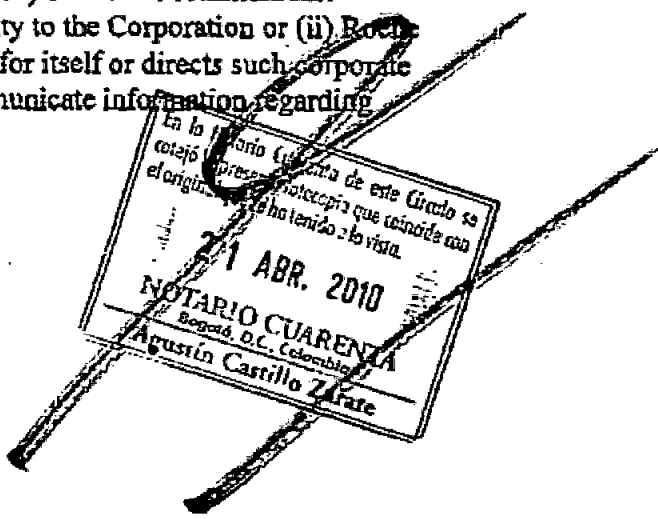
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

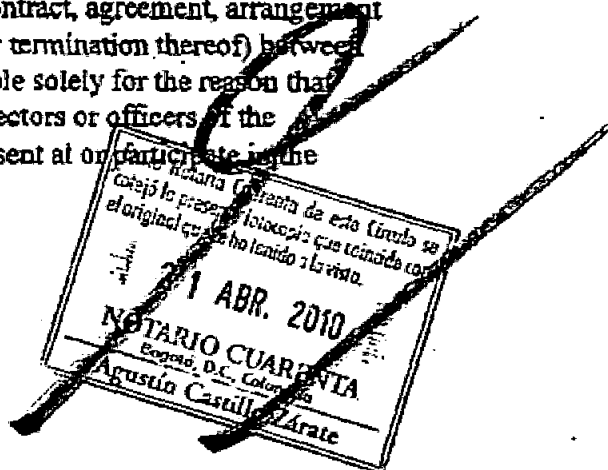
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination: Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. Quorum. Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. No Liability For Good Faith Actions. Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. Deemed Consent by Stockholders. Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

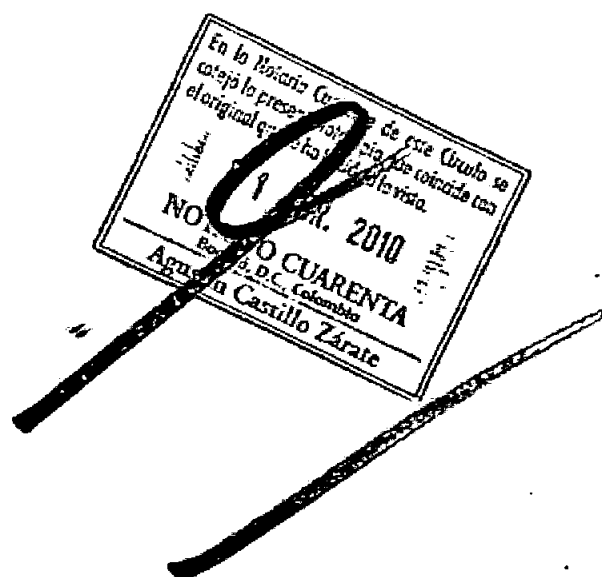
SECTION 9.05. Contracts Covered. For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.

En la Notaría Cuarenta de este Circulo se
 otorgó la presente fotocopia que coincide con
 el original y se ha tenido a la vista.
 1 ABR. 2010
 NOTARIO CUARENTA
 Bogotá, D.C., Colombia
 Agustín Castillo Zafate

80

SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

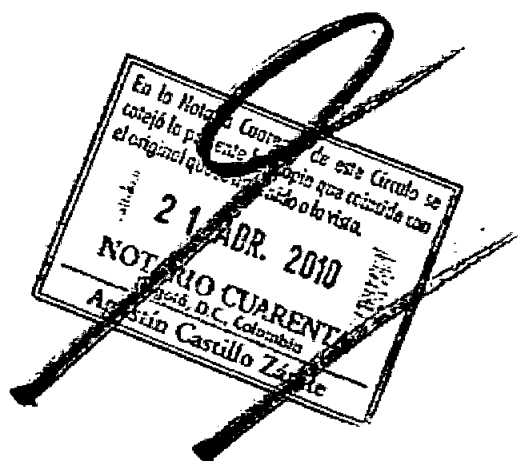
5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 - 24 - 05

84

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "Corporación"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede se modificada la misma en adelante ("Delaware Law").

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

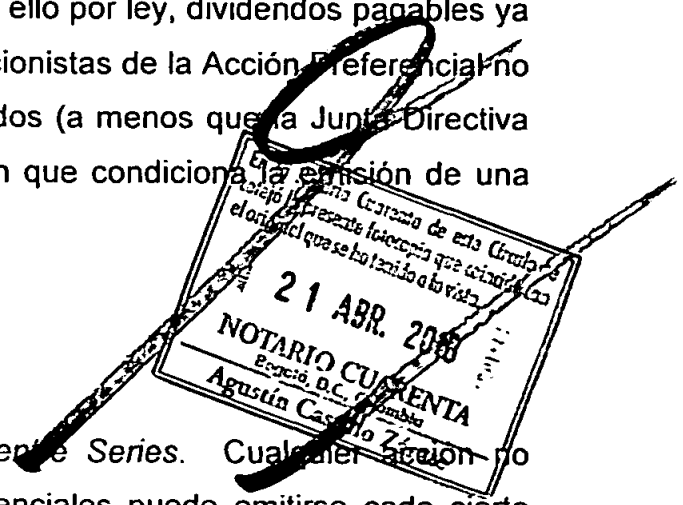
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condicione la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Series y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los



particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

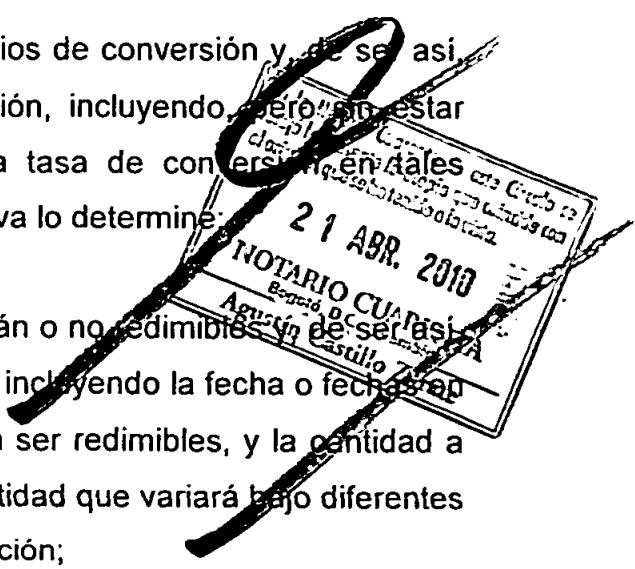
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de una liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación, y



los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por le voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

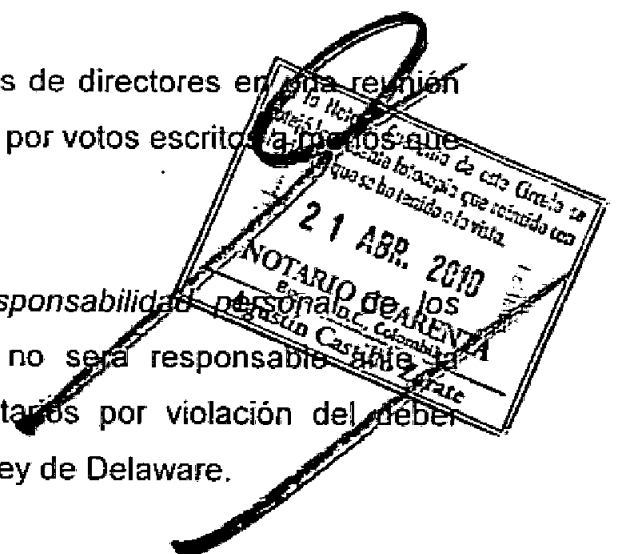
SECCION 6.01: *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier

acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal termino, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad de ciertos directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable a la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de, o esta involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo



permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión con cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

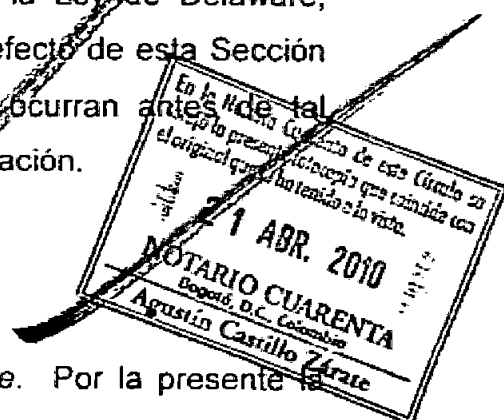
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, Sección 203 de la Ley de Delaware. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



90

ARTICULO 8

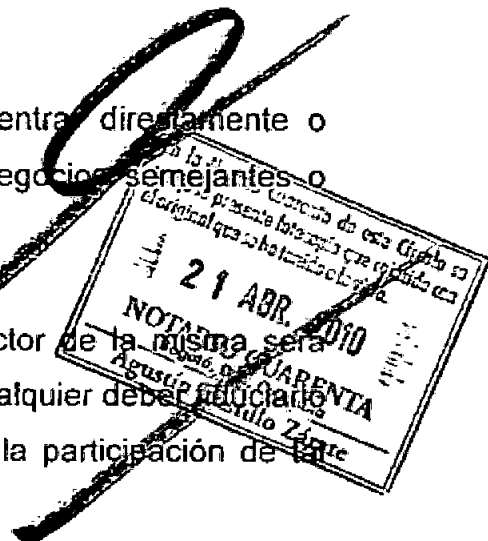
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este articulo 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de la persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiriera conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho



que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiere algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha leído, noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05. *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliados**" (como se



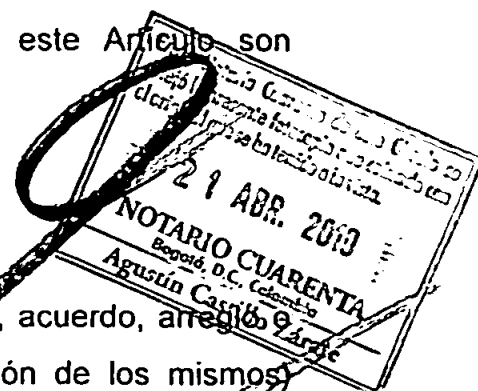
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo, transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

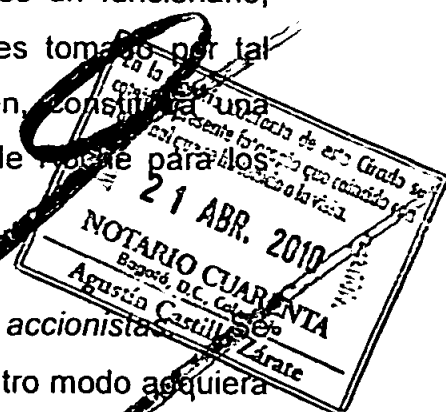


SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiere algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.



SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General / Secretario



97.200
95

Apostille

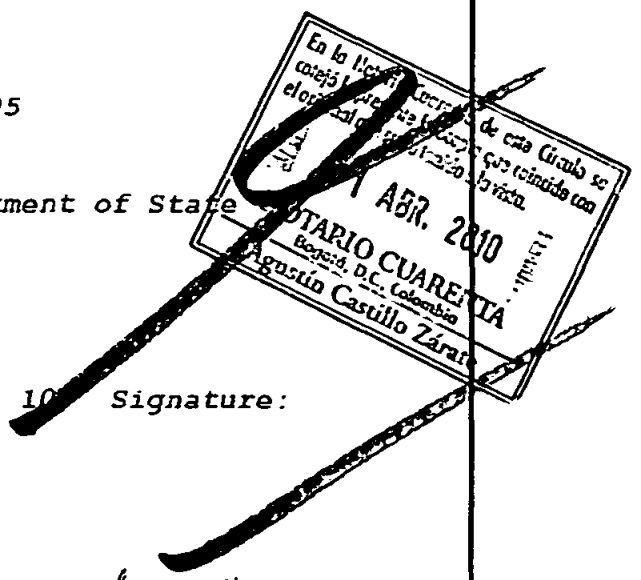
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

- 1. Country: United States of America
- 2. This public document:
 - has been signed by Harriet Smith Windsor
- 3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
- 4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

- 5. at Dover, Delaware
- 6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
- 7. by Secretary of State, Delaware Department of State
- 8. No. 0254031

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

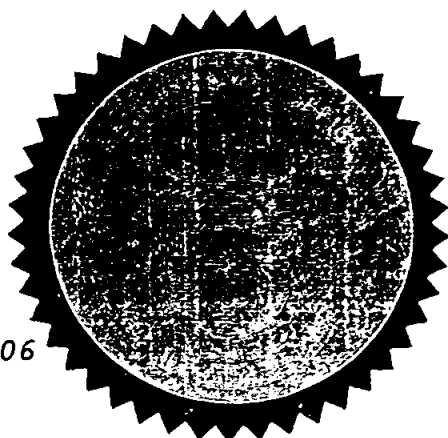
Delaware

PAGE 1

96

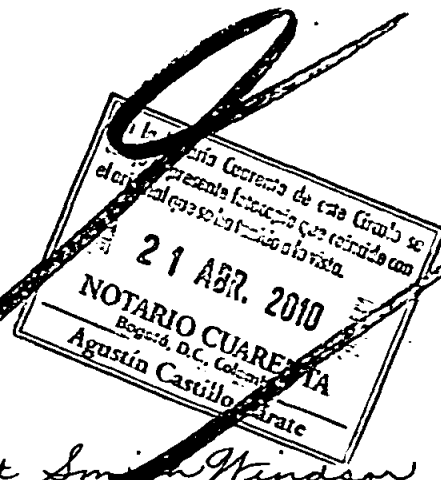
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

99

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

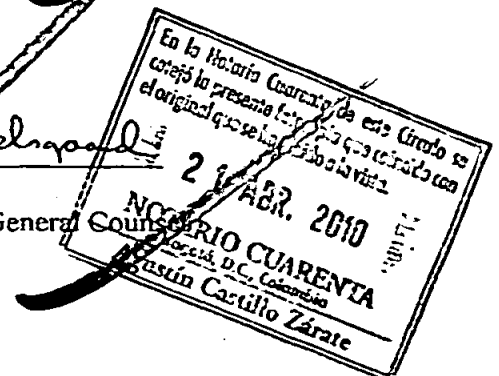
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

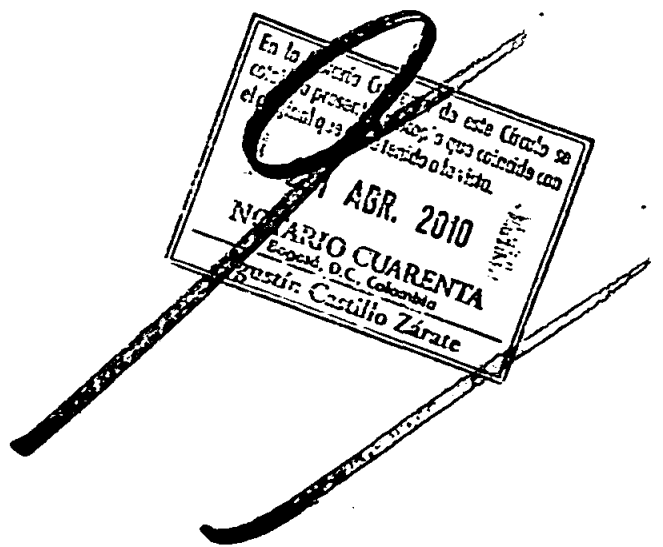
Harriet Smith Windsor (Firma)

Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 - 24 - 05

100

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. ~~En millones~~ (100,000,000) de acciones serán designadas ~~acciones~~ acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D: 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

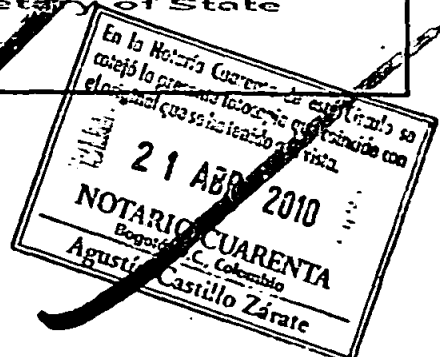
8. No. 0254033

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

103

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

104

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

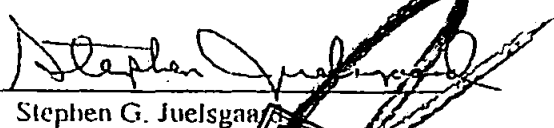
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

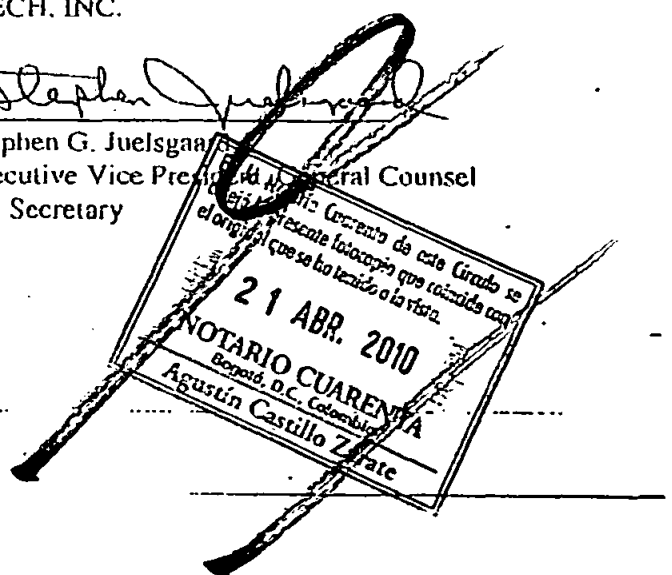
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: 
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President and Secretary

#153087



105

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

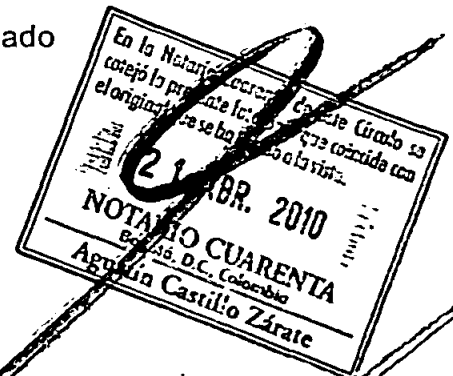
1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

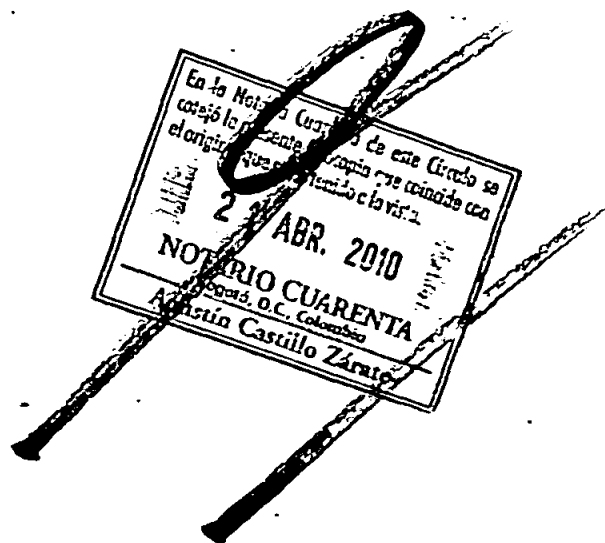
Harriet Smith Windsor (Firma)

Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor Secretaria de Estado

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

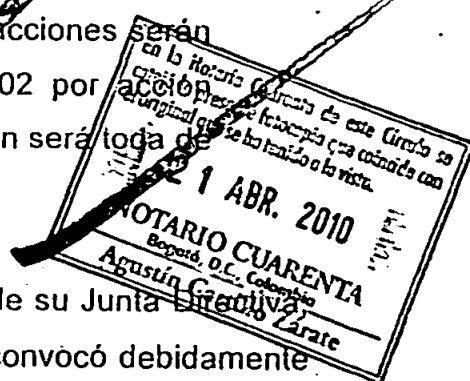
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. De los millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente.



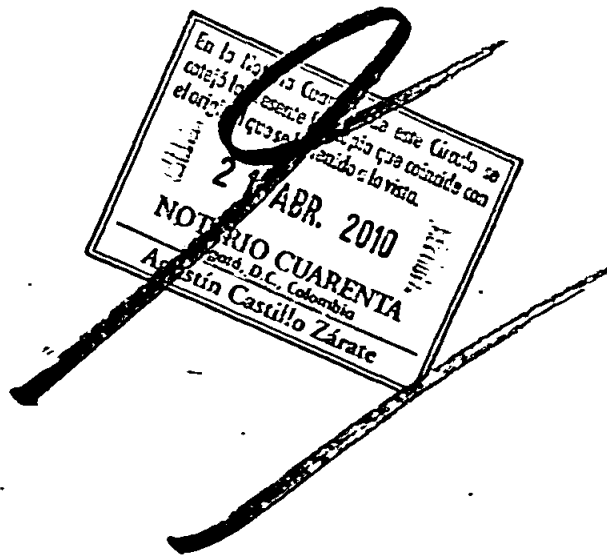
TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaria General.



77 100
6/10
109

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

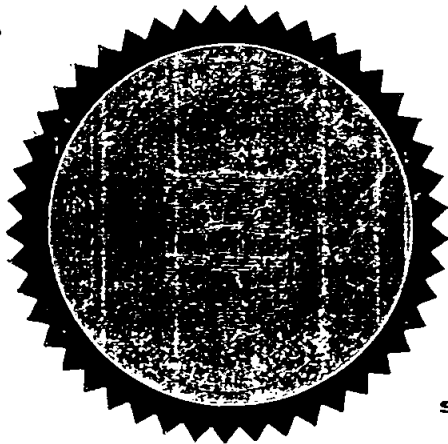
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

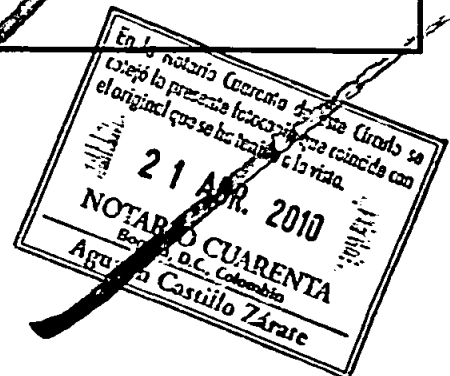
8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

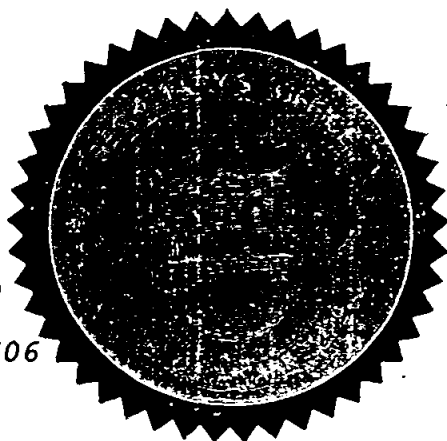


Delaware

PAGE 1

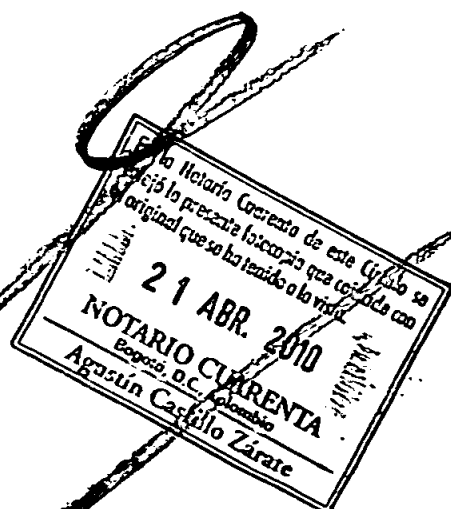
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

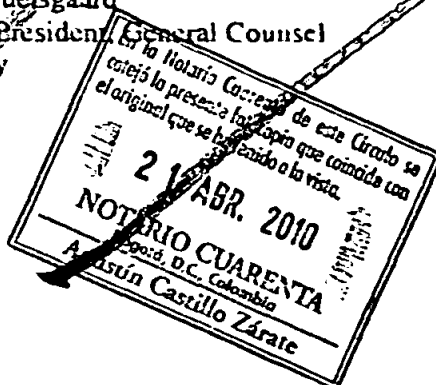
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2008.

GENENTECH, INC.

By: Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

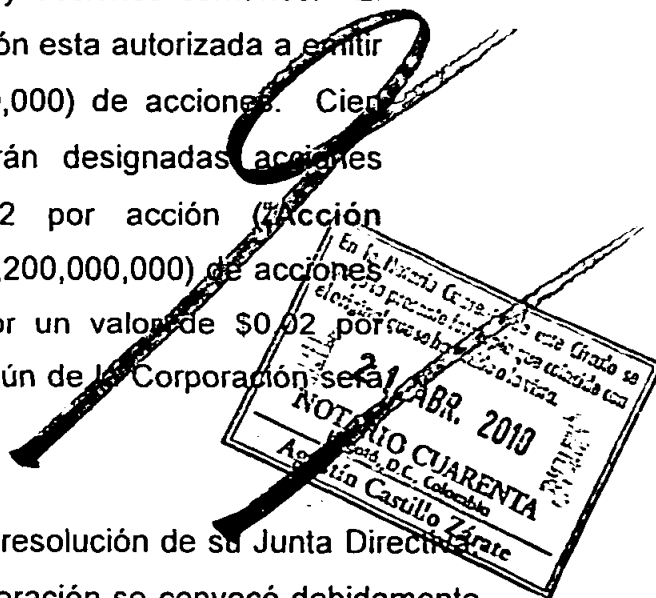
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



915

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo

y Secretaría General.

