

B.T.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



04-111
02

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

05 99863

54. TITULO FORMULACIONES DE PROTEINA Y ANTICUERPO DE ALTA CONCENTRACION

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K 39/395

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC. y NOVARTIS AG

DOMICILIO STH SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA y BASEL, SUIZA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

PETITORIO

AS: 98.868



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Indicacion : 60493863 00000000 Folios: 329
Fecha (AMD): 2005-10-03 16:28:17
Folios : 011 PCT-PATENT 378 FOLIOS NACI 411 PRESENTAL
INDICACION : 60493863 00000000

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 04-11-05

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GENENTECH, INC. y NOVARTIS AG

Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco,
California 94080-4990, Estados Unidos de
América; Lichstrasse 35, CH-4056, Basel, Suiza
(Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América y Suiza (Respectivamente)

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
y Suiza (Respectivamente)

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200

Fax: 380-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Steven J. Shire, Jun Liu

Dirección: 210 Sylvan Way, Emerald Hills, CA 94062, Estados Unidos de América, 1108
Glacier Avenue, Pacifica CA 94044, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/009613

Fecha 29-03-2004

Publicación Internacional No. WO 2004/091658 A1

Fecha 28-10-2004

6 Título (54): FORMULACIONES DE PROTEINA Y ANTICUERPO DE ALTA CONCENTRACION

7 Clasificación Internacional (51)

A61K 39/395

A61K 9/06

47/18

007K 16/18

8 Prioridad

(33) País de
Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒

NO ☐

US

04-04-2003

60/460,659

9 Comprobante de pago No. 05-68,885

Fecha 03-10-2005

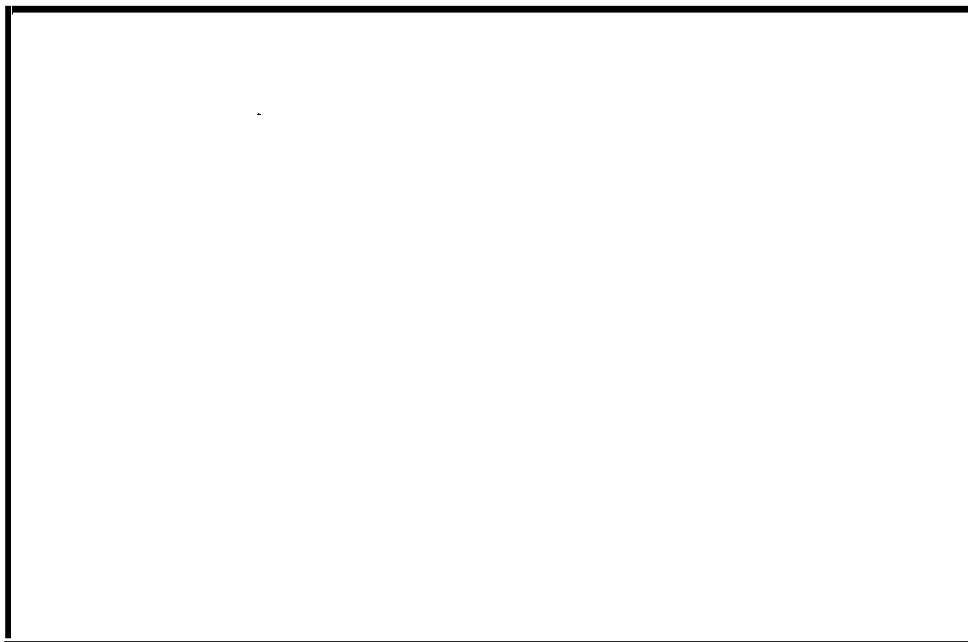
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

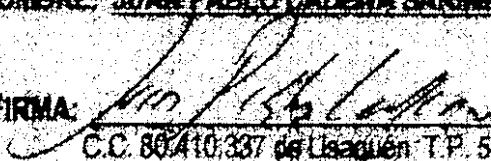
ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$443.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar 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.
- ☒ Otros: Tarjeta de propietarios.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente:

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMENTOFIRMA: 

C.C. 80410337 de Usaquén T.P. 57482 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 150005-01-01 00000000
Fecha (AMD): 2005-10-03 16:28:11
Remite: 011 P.1-P.01 M.1 478 ASE NUCI 411 P.01SEN AC
Referencia: 0000 DIVISION DE NUEVAS CREATIVIDADES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 68,895
FECHA : SEPTIEMBRE 8 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	27975995	08/09/2005	37,220,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443.000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE ☒ PCT/US2004/009613 MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

SOLICITANTE/S RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES GENENTECH, INC. y NOVARTIS AG

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA y BASEL, SUIZA (Respec.)

APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

TITULO FORMULACIONES DE PROTEINA Y ANTICUERPO DE ALTA CONCENTRACION

CLASIFICACION

EXPEDIENTE No FECHA DE SOLICITUD ROLLO MICROFILM

CERTIFICADO No. FECHA DE CONCESION VIGENCIA DESDE HASTA

PRORROGA CAMBIO DE NOMBRE

TRASPASO A

INVENTOR (ES) STEVEN J. SHIRE, JUN LIU

OTROS

OFICINA DE COMUNICACIONES

5
X

PCT/US2004/009613

DATE RECEIVED

SEP 07 2005

GENENTECH, INC.
LEGAL DEPT.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SVOBODA, Craig G.
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 19 August 2005 (19.08.2005)	
Applicant's or agent's file reference P2026R1	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2004/009613	International filing date (day/month/year) 29 March 2004 (29.03.2004)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address NOVARTS AG Lichtstrasse 35 CH-4056 Basel Switzerland	State of Nationality CH	State of Residence CH
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for all designated States except the United States of America.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.89.95	Authorized officer Claudio BORTON (Fax 338-8995) Telephone No. (41-22) 338 8491
--	---

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
28 October 2004 (28.10.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/091658 A1

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/395,
47/18, 47/06 // C07K 16/18

1108 Glacier Avenue, Pacifica, CA 94044 (US). SHIRE,
Steven [US/US]; 210 Sylvan Way, Emerald Hills, CA
94062 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2004/009613

(74) Agents: SVOBODA, Craig G. et al.; GENENTECH,
INC., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990
(US).

(22) International Filing Date: 29 March 2004 (29.03.2004)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/460,659 4 April 2003 (04.04.2003) US

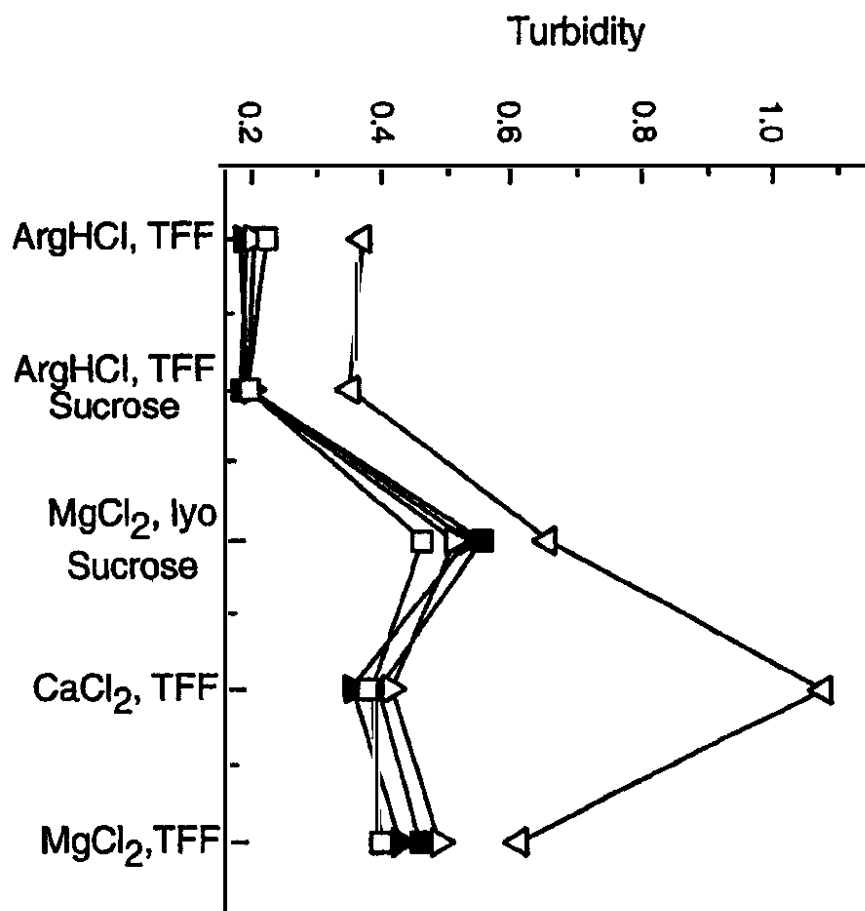
(71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-
TECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco,
CA 94080-4990 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): LIU, Jun [US/US];

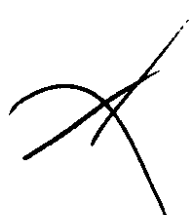
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

[Continued on next page]

(54) Title: HIGH CONCENTRATION ANTIBODY AND PROTEIN FORMULATIONS



(57) Abstract: The present application relates to highly concentrated antibody and protein formulations with reduced viscosity that are stable, relatively isotonic and are of low turbidity. The formulations are particularly suitable for subcutaneous administration. The application further describes articles of manufacture containing such formulations and method for using them to treat disorders treatable by the formulated antibody or protein. The formulations comprise arginine-HCl, histidine and polysorbate.



HIGH CONCENTRATION ANTIBODY AND PROTEIN FORMULATIONS

Background of the Invention

5 Field of the Invention

This invention pertains to highly concentrated formulations of antibodies, which are particularly suitable for subcutaneous administration. The invention further provides stable, highly concentrated (*e.g.*, ≥ 100 mg/ml protein) liquid formulations.

10 Description of the Related Art

There is a significant demand for highly concentrated liquid antibody formulations. However, highly concentrated protein formulations pose several problems. One problem is instability due to the formation of particulates. With reconstituted lyophilized preparations to generate liquid formulations, this problem
15 has been addressed through the use of surfactants (*e.g.*, a polysorbate), but surfactants are unsuitable for liquid formulations, because they render further processing difficult. Moreover, surfactants further do not reduce the increased viscosity caused as a result of numerous intermolecular interactions from the macromolecular nature of antibodies.

20 Although surfactants have been shown to significantly reduce the degree of particulate formation of proteins, they do not address the problem of increased viscosity that makes difficult the manipulation and administration of concentrated antibody formulations. Antibodies tend to form viscous solutions at high concentration because of their macromolecular nature and potential for intermolecular
25 interactions. Moreover, pharmaceutically acceptable sugars are often used in large amounts as stabilizers. Such sugars can enhance the intermolecular interactions, thereby increasing the viscosity of the formulation. Highly viscous formulations are difficult to manufacture, draw into a syringe and inject subcutaneously. The use of force in manipulating the viscous formulations leads to excessive frothing, which can
30 lead to denaturation and inactivation of active biologics. Satisfactory solution of this problem is lacking.

While the prior art indicates numerous example of excipients that can be suitably employed to create pharmaceutical formulations, very few proteins have been successfully formulated above 100 mg/ml, or have techniques for doing so been described.

5 Applicants have discovered that Arginine, specifically Arginine-HCl is particularly suited for highly concentrated liquid protein or antibody formulations.

Stable isotonic lyophilized protein formulations are disclosed in PCT publication WO 97/04801, published on February 13, 1997, the entire disclosure of which is hereby expressly incorporated by reference. The disclosed lyophilized
10 formulations can be reconstituted to generate high protein-concentration liquid formulations without apparent loss of stability. However, the potential issues associated with the high viscosity of the reconstituted formulations are not addressed. Protein aggregation has been reduced previously through the addition of sugars, but doing so can dramatically increase the viscosity and osmolarity, thereby rendering
15 processing and use impractical.

Applicants PCT application, publication WO02/30463, published 18 April 2002 discloses high protein concentration, but low viscosity formulations achieved: 1) through low pH (about 4.0 to 5.3); 2) high pH (about 6.5 to 12.0), or 3) increasing the total ionic strength of the formulation by the addition of salts or buffers.
20 However, while increased ionic strength does decrease the viscosity of the formulation (such as with NaCl), it may also result also result in increased turbidity of the solution, which is often associated with the formation of protein particles (e.g., aggregation). Thus an optimal high concentration protein formulation must overcome challenges of stability, viscosity, osmolarity and turbidity.

25

Summary of the Invention

The present invention concerns highly concentrated protein or antibody formulations that are stable, and of low viscosity and turbidity.

In particular, the present invention concerns highly concentrated antibody
30 formulations of low turbidity comprising protein or antibody (100 – 260 mg/ml), histidine (10 – 100 mM), arginine-HCl (50 – 200 mM) and polysorbate (0.01% - 0.1%), having a pH of 5.5 - 7.0, a viscosity of 50 cs or less and osmolarity from 200

mOsm/kg - 450 mOsm/kg. Alternatively, the protein or antibody in the formulations can range from 120 - 260 mg/ml, alternatively 150 - 260 mg/ml, alternatively 180 - 260 mg/ml, alternatively 200 - 260 mg/ml protein or antibody. Alternatively the osmolarity ranges from 250 mOsm/kg - 350 mOsm/kg. Alternatively, the concentration of arginine-HCl ranges from 100 - 200 mM, alternatively 150 - 200 mM, alternatively 180 - 200 mM.

Alternatively, the present invention concerns a highly concentrated antibody formulations of low turbidity comprising antibody (40 - 150 mg/ml), histidine (10 - 100 mM), sugar (*e.g.*, trehalose or sucrose, 20 - 350 mM) and polysorbate (0.01% - 0.1%).

In a particular embodiment, the invention provides a formulation containing high concentrations of large molecular weight proteins, such as antibodies or immunoglobulins. The antibodies may, for example, be antibodies directed against a particular predetermined antigen. In a specific aspect, the antigen is IgE (*e.g.*, rhuMAbE-25 and rhuMAbE-26 described in U.S.P. 6,329,509 and WO 99/01556). Alternatively, the anti-IgE antibody can be CGP-5101 (Hu-901) described in Corne *et al.*, *J. Clin. Invest.* 99(5): 879-887 (1997), WO92/17207, and ATTC Deposit Nos. BRL-10706 and 11130, 11131, 11132, 11133. Alternatively, the antigen may include: the CD proteins CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 and CD40; members of the HER receptor family such as EGF receptor, HER2, HER3 or HER4 receptor; 2C4, 4D5, PSCA, LDP-2, cell adhesion molecules such as LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM and $\alpha v/\beta 3$ integrin including the α - and β -subunits thereof (*e.g.*, anti-CD11a, anti-CD18 or anti-CD11b antibodies); growth factors such as VEGF; blood group antigens; flk2/flt3 receptor; obesity (OB) receptor; *mpl* receptor, CTLA-4, and protein C.

The formulations of the present invention may be pharmaceutical formulations. In a specific aspect, the formulation is delivered subcutaneously.

In yet another embodiment, the invention provides a method for the treatment, prophylactic or therapeutic, of a disorder treatable by the protein or antibody formulated, comprising administering the formulations disclosed herein comprising a therapeutically effective amount of the protein or antibody. Such formulations are particularly useful for subcutaneous administration. In a specific aspect, the disorder

is an IgE-mediated disorder. In yet a further specific aspect, the IgE-mediated disorder is allergic rhinitis, asthma (*e.g.*, allergic asthma and non-allergic asthma), atopic dermatitis, allergic gastroenteropathy, hypersensitivity (*e.g.*, anaphylaxis, urticaria, food allergies *etc.*), allergic bronchopulmonary aspergillosis, parasitic diseases, interstitial cystitis, hyper-IgE syndrome, ataxia-telangiectasia, Wiskott-Aldrich syndrome, thymic lymphoplasia, IgE myeloma and graft-versus-host reaction.

In yet another embodiment, the invention provides an article of manufacture comprising a container enclosing a formulation disclosed herein. In one aspect, the article of manufacture is pre-filled syringe. In yet another specific aspect, the pre-filled syringe is further containing within an injection device. In yet another specific aspect, the injection device is an auto-injector.

Brief Description of the Drawings

Figure 1. Hydrophobic interaction chromatography of a pepsin digested anti-IgE monoclonal antibody. Samples were formulated at different pH and buffers: (●) 20 mM Acetate, (Δ) 20 mM Succinate, (▲) 20 mM Na₂HPO₄, (Λ) 20 mM K₂PO₄ and (*) 20 mM Tris buffer. The samples were stored at 30 °C for 6 months.

Figure 2. Size exclusion chromatography of an anti-IgE monoclonal antibody stored at 40°C for 6 months. Samples were formulated at different pH and buffers: (■) 20 mM Glutamate, (●) 20 mM Acetate, (Δ) 20 mM Succinate, (□) 20 mM Histidine, (▲) 20 mM Na₂HPO₄, (▼) 20 mM K₂PO₄ and (*) 20 mM Tris buffer.

Figure 3. Activity of an anti-IgE monoclonal antibody stored at 30°C for 6 months. Samples were formulated at different pH and buffers: (●) 20 mM Acetate, (Δ) 20 mM Succinate, (□) 20 mM Histidine, (▲) 20 mM Na₂HPO₄, (▼) 20 mM K₂PO₄ and (*) 20 mM Tris buffer.

Figure 4. Effects of Polysorbate 20 on turbidity of the stressed anti-IgE monoclonal antibody. Samples contain 100 mg/ml antibody, 20 mM Succinate, 192

mM Trehalose and various amounts of polysorbate 20 at pH 6.0. The polysorbate concentrations are (■) 0, (▲) 0.01%, (●) 0.02% and (Δ) 0.05%.

Figure 5. Turbidity of an anti-IgE monoclonal antibody at ~150 mg/ml with different excipients (▲) CaCl_2 , (▼) MgCl_2 and (Δ) Arginine-HCl

Figure 6. Turbidity of anti-IgE monoclonal antibody at ~150 mg/ml with various excipients. The samples were stored at (▲) -70°C , (■) $2-8^\circ\text{C}$, (Δ) 15°C , (□) 30°C and (▼) 40°C .

Figure 7. Hydrophobic interaction chromatography analyses of papain digested anti-IgE monoclonal antibody. Samples were formulated at ~150 mg/ml with various of excipients and stored at (▼) -70°C , (■) $2-8^\circ\text{C}$, (▲) 15°C , (Δ) 30°C and (□) 40°C .

Figure 8. Size exclusion chromatography of anti-IgE monoclonal antibody at ~150 mg/ml in (■) 200 mM arginine-HCl, 23 mM histidine, pH 6.0 (▲) 182 mM arginine-HCl, 20 mM histidine, pH 6.0 (●) 182 mM arginine-HCl, 20 mM histidine, 91 mM sucrose, pH 6.0 (□) 50 mM MgCl_2 , 27 mg/ml trehalose, 0.01% acetate, (Δ) 50 mM MgCl_2 , 30 mM MgAc_2 , 0.01% acetate, and (○) 50 mM MgCl_2 , 45 mM MgAc_2 , 0.01% acetate. Samples were stored at 30°C for 6 months.

Figure 9. Hydrophobic interaction chromatography analyses of papain digested anti-IgE monoclonal antibody. The samples show were formulated in (■) 200 mM arginine-HCl, 23 mM histidine, (▲) 182 mM arginine-HCl, 20 mM histidine, (●) 182 mM arginine-HCl, 20 mM histidine, 91 mM sucrose, (□) 50 mM MgCl_2 , 27 mg/ml trehalose, 0.01% acetate, (Δ) 50 mM MgCl_2 , 30 mM MgAc_2 , 0.01% acetate and (○) 50 mM MgCl_2 , 45 mM MgAc_2 , 0.01% acetate. Samples were stored at 30°C for 6 months.

Figure 10. Shows a comparison of the full-length sequences both variable and constant chains) of the anti-IgE antibodies E25, E26 and Hu-901. The CDR regions

of Hu-901 is shown by underline. For E25 and E26, the CDR regions as defined by Chothia are shown in boldface, while the CDR region as defined by Kabat are delineated with brackets. Figure 10A shows the light chain sequences of E25, E26 and Hu-901 (SEQ ID NOS:1-3), while Figure 10B shows the heavy chain sequences of E25, E26 and Hu-901 (SEQ ID NOS:4-6).

Detailed Description of the Preferred Embodiment

I. Definitions

By "protein" is meant a sequence of amino acids for which the chain length is sufficient to produce the higher levels of tertiary and/or quaternary structure. Thus, proteins are distinguished from "peptides" which are also amino acid - based molecules that do not have such structure. Typically, a protein for use herein will have a molecular weight of at least about 15-20 kD, preferably at least about 20 kD.

Examples of proteins encompassed within the definition herein include mammalian proteins, such as, *e.g.*, growth hormone, including human growth hormone and bovine growth hormone; growth hormone releasing factor; parathyroid hormone; thyroid stimulating hormone; lipoproteins; α -1-antitrypsin; insulin A-chain; insulin B-chain; proinsulin; follicle stimulating hormone; calcitonin; luteinizing hormone; glucagon; clotting factors such as factor VIIIC, factor IX, tissue factor, and von Willebrands factor; anti-clotting factors such as Protein C; atrial natriuretic factor; lung surfactant; a plasminogen activator, such as urokinase or tissue-type plasminogen activator (t-PA, *e.g.*, Activase[®], TNKase[®], Retevase[®]); bombazine; thrombin; tumor necrosis factor- α and - β ; enkephalinase; RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); human macrophage inflammatory protein (MIP-1- α); serum albumin such as human serum albumin; mullerian-inhibiting substance; relaxin A-chain; relaxin B-chain; prorelaxin; mouse gonadotropin-associated peptide; DNase; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor (VEGF); receptors for hormones or growth factors; an integrin; protein A or D; rheumatoid factors; a neurotrophic factor such as bone-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3, -4, -5, or -6 (NT-3, NT-4, NT-5, or NT-6), or a nerve growth factor such as NGF- β ; platelet-derived growth factor (PDGF); fibroblast

growth factor such as aFGF and bFGF; epidermal growth factor (EGF); transforming growth factor (TGF) such as TGF- α and TGF- β , including TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, or TGF- β 5; insulin-like growth factor-I and -II (IGF-I and IGF-II); des(1-3)-IGF-I (brain IGF-I); insulin-like growth factor binding proteins; CD proteins
5 such as CD3, CD4, CD8, CD19 and CD20; erythropoietin (EPO); thrombopoietin (TPO); osteoinductive factors; immunotoxins; a bone morphogenetic protein (BMP); an interferon such as interferon- α , - β , and - γ ; colony stimulating factors (CSFs), e.g., M-CSF, GM-CSF, and G-CSF; interleukins (ILs), e.g., IL-1 to IL-10; superoxide dismutase; T-cell receptors; surface membrane proteins; decay accelerating factor
10 (DAF); a viral antigen such as, for example, a portion of the AIDS envelope; transport proteins; homing receptors; addressins; regulatory proteins; immunoadhesins; antibodies; and biologically active fragments or variants of any of the above-listed polypeptides.

The protein which is formulated is preferably essentially pure and desirably
15 essentially homogeneous (*i.e.* free from contaminating proteins). "Essentially pure" protein means a composition comprising at least about 90% by weight of the protein, based on total weight of the composition, preferably at least about 95% by weight. "Essentially homogeneous" protein means a composition comprising at least about 99% by weight of protein, based on total weight of the composition.

20 In certain embodiments, the protein is an antibody. The antibody may bind to any of the above-mentioned molecules, for example. Exemplary molecular targets for antibodies encompassed by the present invention include IgE, the CD proteins CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 and CD40; members of the HER receptor family such as EGF receptor, HER2, HER3 or HER4 receptor; 2c4, 4D5, PSCA, LDP-2, cell
25 adhesion molecules such as LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM and α v/ β 3 integrin including the α - and β -subunits thereof (e.g., anti-CD11a, anti-CD18 or anti-CD11b antibodies); growth factors such as VEGF; blood group antigens; flk2/flt3 receptor; obesity (OB) receptor; *mpl* receptor, CTLA-4, and protein C.

The term "antibody" as used wherein includes monoclonal antibodies
30 (including full length antibodies which have an immunoglobulin Fc region), antibody compositions with polyepitopic specificity, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies, diabodies, and single-chain molecules, as well as antibody fragments (e.g.,

Fab, F(ab')₂, and Fv). The term "immunoglobulin" (Ig) is used interchangeably with "antibody" herein.

The basic 4-chain antibody unit is a heterotetrameric glycoprotein composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. An IgM antibody consists of 5 of the basic heterotetramer unit along with an additional polypeptide called a J chain, and contains 10 antigen binding sites, while IgA antibodies comprise from 2-5 of the basic 4-chain units which can polymerize to form polyvalent assemblages in combination with the J chain. In the case of IgGs, the 4-chain unit is generally about 150,000 daltons. Each L chain is linked to an H chain by one covalent disulfide bond, while the two H chains are linked to each other by one or more disulfide bonds depending on the H chain isotype. Each H and L chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each H chain has at the N-terminus, a variable domain (V_H) followed by three constant domains (C_H) for each of the α and γ chains and four C_H domains for μ and ε isotypes. Each L chain has at the N-terminus, a variable domain (V_L) followed by a constant domain at its other end. The V_L is aligned with the V_H and the C_L is aligned with the first constant domain of the heavy chain (C_{H1}). Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light chain and heavy chain variable domains. The pairing of a V_H and V_L together forms a single antigen-binding site. For the structure and properties of the different classes of antibodies, see *e.g.*, *Basic and Clinical Immunology*, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

The L chain from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa and lambda, based on the amino acid sequences of their constant domains. Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains (CH), immunoglobulins can be assigned to different classes or isotypes. There are five classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG and IgM, having heavy chains designated α, δ, ε, γ and μ, respectively. The γ and μ classes are further divided into subclasses on the basis of relatively minor differences in the CH sequence and function, *e.g.*, humans express the following subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2.

The term "variable" refers to the fact that certain segments of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies. The V domain mediates antigen binding and defines the specificity of a particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed across the entire span of the variable domains. Instead, the V regions consist of relatively invariant stretches called framework regions (FRs) of about 15-30 amino acid residues separated by shorter regions of extreme variability called "hypervariable regions" or sometimes "complementarity determining regions" (CDRs) that are each approximately 9-12 amino acid residues in length. The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FRs, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three hypervariable regions, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The hypervariable regions in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the hypervariable regions from the other chain, contribute to the formation of the antigen binding site of antibodies (see Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

The term "hypervariable region" (also known as "complementarity determining regions" or CDRs) when used herein refers to the amino acid residues of an antibody which are (usually three or four short regions of extreme sequence variability) within the V-region domain of an immunoglobulin which form the antigen-binding site and are the main determinants of antigen specificity. There are at least two methods for identifying the CDR residues: (1) An approach based on cross-species sequence variability (*i.e.*, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, MS 1991); and (2) An approach based on crystallographic studies of antigen-antibody complexes (Chothia, C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). However, to the extent that two residue identification techniques define regions of overlapping, but not identical regions, they can be combined to define a hybrid CDR.

16
10

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations and/or post-translation modifications (*e.g.*, isomerizations, amidations) that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they are synthesized by the hybridoma culture, uncontaminated by other immunoglobulins. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), for example.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is(are) identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Chimeric antibodies of interest herein include "primitized" antibodies comprising variable domain antigen-binding sequences derived from a non-human primate (*e.g.*, Old World Monkey, Ape *etc.*) and human constant region sequences.

An "intact" antibody is one which comprises an antigen-binding site as well as a CL and at least the heavy chain domains, C_H1, C_H2 and C_H3. The constant domains may be native sequence constant domains (e.g., human native sequence constant domains) or amino acid sequence variants thereof. Preferably, the intact antibody has one or more effector functions.

An "antibody fragment" comprises a portion of an intact antibody, preferably the antigen binding and/or the variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂ and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (see U.S. Patent 5,641,870, Example 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); single-chain antibody molecules and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Papain digestion of antibodies produced two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, and a residual "Fc" fragment, a designation reflecting the ability to crystallize readily. The Fab fragment consists of an entire L chain along with the variable region domain of the H chain (V_H), and the first constant domain of one heavy chain (C_H1). Each Fab fragment is monovalent with respect to antigen binding, *i.e.*, it has a single antigen-binding site. Pepsin treatment of an antibody yields a single large F(ab')₂ fragment which roughly corresponds to two disulfide linked Fab fragments having different antigen-binding activity and is still capable of cross-linking antigen. Fab' fragments differ from Fab fragments by having a few additional residues at the carboxy terminus of the C_H1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')₂ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The Fc fragment comprises the carboxy-terminal portions of both H chains held together by disulfides. The effector functions of antibodies are determined by sequences in the Fc region, the region which is also recognized by Fc receptors (FcR) found on certain types of cells.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and -binding site. This fragment consists of a dimer of one heavy- and

one light-chain variable region domain in tight, non-covalent association. From the folding of these two domains emanate six hypervariable loops (3 loops each from the H and L chain) that contribute the amino acid residues for antigen binding and confer antigen binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

"Single-chain Fv" also abbreviated as "sFv" or "scFv" are antibody fragments that comprise the V_H and V_L antibody domains connected into a single polypeptide chain. Preferably, the sFv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of the sFv, see Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

The term "diabodies" refers to small antibody fragments prepared by constructing sFv fragments (see preceding paragraph) with short linkers (about 5-10 residues) between the V_H and V_L domains such that inter-chain but not intra-chain pairing of the V domains is achieved, thereby resulting in a bivalent fragment, *i.e.*, a fragment having two antigen-binding sites. Bispecific diabodies are heterodimers of two "crossover" sFv fragments in which the V_H and V_L domains of the two antibodies are present on different polypeptide chains. Diabodies are described in greater detail in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

An antibody that "specifically binds to" or is "specific for" a particular polypeptide or an epitope on a particular polypeptide is one that binds to that particular polypeptide or epitope on a particular polypeptide without substantially binding to any other polypeptide or polypeptide epitope.

The term "solid phase" describes a non-aqueous matrix to which the antibody of the present invention can adhere. Examples of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (*e.g.*, controlled pore glass), polysaccharides (*e.g.*, agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well of an assay plate; in others it is a purification column (*e.g.*, an

affinity chromatography column). This term also includes a discontinuous solid phase of discrete particles, such as those described in U.S. Patent No. 4,275,149.

"Humanized" forms of non-human (*e.g.*, murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) of mostly human sequences, which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region (also CDR) of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, "humanized antibodies" as used herein may also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor the donor antibody. These modifications are made to further refine and optimize antibody performance. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

A "species-dependent antibody", *e.g.* a mammalian anti-human IgE antibody, is an antibody which has a stronger binding affinity for an antigen from a first mammalian species than it has for a homologue of that antigen from a second mammalian species. Normally, the species-dependent antibody "bind specifically" to a human antigen (*i.e.*, has a binding affinity (K_d) value of no more than about 1×10^{-7} M, alternatively no more than about 1×10^{-8} M, alternatively no more than about 1×10^{-9} M) but has a binding affinity for a homologus of the antigen from a second non-human mammalian species which is at least about 50 fold, at least about 500 fold, or at least about 1000 fold, waker than it binding affinity for the non-human antigen. The species-dependent antibody can be of any of the various types of antibodies as defined above, but preferably is a humanized or human antibody.

Antibody "effector functions" refer to those biological activities attributable to the Fc region (a native sequence Fc region or amino acid sequence variant Fc region)

of an antibody, and vary with the antibody isotype. Examples of antibody effector functions include: C1q binding and complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody—dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (*e.g.*, B cell receptors); and B cell activation.

5 "Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" or ADCC refers to a form of cytotoxicity in which secreted Ig bound onto Fc receptors (FcRs) present on certain cytotoxic cells (*e.g.*, natural killer (NK) cells, neutrophils and macrophages) enable these cytotoxic effector cells to bind specifically to an antigen-bearing target cell and subsequently kill the target cell with cytotoxins. The antibodies "arm" the cytotoxic
10 cells and are required for killing of the target cell by this mechanism. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII and FcγRIII. Fc expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an *in vitro* ACDD
15 assay, such as that described in U.S. Patent No. 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and natural killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, *e.g.*, in an animal model such as that disclosed in Clynes *et al.*, *PNAS USA* 95:652-656
20 (1998).

"Fc receptor" or "FcR" describes a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and FcγRIII subclasses, including allelic variants and alternatively
25 spliced forms of these receptors, FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor FcγRIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor FcγRIIB contains an
30 immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain. (see M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*,

Immunomethods 4: 25-34 (1994); and de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus. Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994).

"Human effector cells" are leukocytes which express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least FcγRIII and perform ADCC effector function. Examples of human leukocytes which mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils, with PBMCs and MNK cells being preferred. The effector cells may be isolated from a native source, *e.g.*, blood.

"Complement dependent cytotoxicity" of "CDC" refers to the lysis of a target cell in the presence of complement. Activation of the classical complement pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to antibodies (of the appropriate subclass) which are bound to their cognate antigen. To assess complement activation, a CDC assay, *e.g.*, as described in Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996), may be performed.

"Isolated" when used to describe the various polypeptides and antibodies disclosed herein, means a polypeptide or antibody that has been identified, separated and/or recovered from a component of its production environment. Preferably, the isolated polypeptide is free of association with all other components from its production environment. Contaminant components of its production environment, such as that resulting from recombinant transfected cells, are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the polypeptide will be purified (1) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Ordinarily, however, an isolated polypeptide or antibody will be prepared by at least one purification step.

An "isolated" nucleic acid molecule encoding the polypeptides and antibodies herein is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the environment in which it was produced. Preferably, the isolated nucleic acid is free of association with all components associated with the production environment. The isolated nucleic acid molecules encoding the polypeptides and antibodies herein is in a form other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from nucleic acid encoding the polypeptides and antibodies herein existing naturally in cells.

The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

The term "epitope tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising a polypeptide or antibody described herein fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the polypeptide to which it is fused. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes.

27 12 23

Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues (preferably, between about 10 and 20 amino acid residues).

As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules which combine the binding specificity of a heterologous protein (an "adhesin") with the effector functions of immunoglobulin constant domains. Structurally, the immunoadhesins comprise a fusion of an amino acid sequence with the desired binding specificity which is other than the antigen recognition and binding site of an antibody (*i.e.*, is "heterologous"), and an immunoglobulin constant domain sequence. The adhesin part of an immunoadhesin molecule typically is a contiguous amino acid sequence comprising at least the binding site of a receptor or a ligand. The immunoglobulin constant domain sequence in the immunoadhesin may be obtained from any immunoglobulin, such as IgG-1, IgG-2, IgG-3, or IgG-4 subtypes, IgA (including IgA-1 and IgA-2), IgE, IgD or IgM. The Ig fusions preferably include the substitution of a domain of a polypeptide or antibody described herein in the place of at least one variable region within an Ig molecule. In a particularly preferred embodiment, the immunoglobulin fusion includes the hinge, CH2 and CH3, or the hinge, CH1, CH2 and CH3 regions of an IgG1 molecule. For the production of immunoglobulin fusions see also US Patent No. 5,428,130 issued June 27, 1995.

A "stable" formulation is one in which the protein therein essentially retains its physical and chemical stability and integrity upon storage. Various analytical techniques for measuring protein stability are available in the art and are reviewed in *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) and Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). Stability can be measured at a selected temperature for a selected time period. For rapid screening, the formulation may be kept at 40°C for 2 weeks to 1 month, at which time stability is measured. Where the formulation is to be stored at 2-8°C, generally the formulation should be stable at 30°C or 40°C for at least 1 month and/or stable at 2-8°C for at least 2 years. Where the formulation is to be stored at 30°C, generally the formulation should be stable for at least 2 years at 30°C and/or stable at 40°C for at least 6 months. For example, the extent of aggregation during storage can be used as an indicator of protein stability. Thus, a "stable" formulation may be one

24 18 24

wherein less than about 10% and preferably less than about 5% of the protein are present as an aggregate in the formulation. In other embodiments, any increase in aggregate formation during storage of the formulation can be determined.

5 A "reconstituted" formulation is one which has been prepared by dissolving a lyophilized protein or antibody formulation in a diluent such that the protein throughout. The reconstituted formulation is suitable for administration (e.g. parenteral administration) to a patient to be treated with the protein of interest and, in certain embodiments of the invention, may be one which is suitable for subcutaneous administration.

10 An "isotonic" formulation is one which has essentially the same osmotic pressure as human blood. Isotonic formulations will generally have an osmotic pressure from about 250 to 350 mOsm. The term "hypotonic" describes a formulation with an osmotic pressure below that of human blood. Correspondingly, the term "hypertonic" is used to describe a formulation with an osmotic pressure
15 above that of human blood. Isotonicity can be measured using a vapor pressure or ice-freezing type osmometer, for example. The formulations of the present invention are hypertonic as a result of the addition of salt and/or buffer.

A "reconstituted" formulation is one which has been prepared by dissolving a lyophilized protein formulation in a diluent such that the protein is dispersed in the
20 reconstituted formulation. The reconstituted formulation is suitable for administration (e.g. parenteral administration) to a patient to be treated with the protein of interest and, in certain embodiments of the invention, may be one which is suitable for subcutaneous administration.

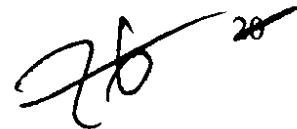
A "pharmaceutically acceptable acid" includes inorganic and organic acids
25 which are non toxic at the concentration and manner in which they are formulated. For example, suitable inorganic acids include hydrochloric, perchloric, hydrobromic, hydroiodic, nitric, sulfuric, sulfonic, sulfinic, sulfanilic, phosphoric, carbonic, *etc.* Suitable organic acids include straight and branched-chain alkyl, aromatic, cyclic, cycloaliphatic, arylaliphatic, heterocyclic, saturated, unsaturated, mono, di- and tri-
30 carboxylic, including for example, formic, acetic, 2-hydroxyacetic, trifluoroacetic, phenylacetic, trimethylacetic, *t*-butyl acetic, anthranilic, propanoic, 2-hydroxypropanoic, 2-oxopropanoic, propandioic, cyclopentanepropionic,

cyclopentane propionic, 3-phenylpropionic, butanoic, butandioic, benzoic, 3-(4-hydroxybenzoyl)benzoic, 2-acetoxy-benzoic, ascorbic, cinnamic, lauryl sulfuric, stearic, muconic, mandelic, succinic, embonic, fumaric, malic, maleic, hydroxymaleic, malonic, lactic, citric, tartaric, glycolic, glyconic, gluconic, pyruvic, glyoxalic, oxalic, mesylic, succinic, salicylic, phthalic, palmoic, palmeic, thiocyanic, methanesulphonic, ethanesulphonic, 1,2-ethanedisulfonic, 2-hydroxyethanesulfonic, benzenesulphonic, 4-chorobenzenesulfonic, naphthalene-2-sulphonic, *p*-toluenesulphonic, camphorsulphonic, 4-methylbicyclo[2.2.2]-oct-2-ene-1-carboxylic, glucoheptonic, 4,4'-methylenebis-3-(hydroxy-2-ene-1-carboxylic acid), hydroxynaphthoic.

"Pharmaceutically-acceptable bases" include inorganic and organic bases were are non-toxic at the concentration and manner in which they are formulated. For example, suitable bases include those formed from inorganic base forming metals such as lithium, sodium, potassium, magnesium, calcium, ammonium, iron, zinc, copper, manganese, aluminum, N-methylglucamine, morpholine, piperidine and organic nontoxic bases including, primary, secondary and tertiary amine, substituted amines, cyclic amines and basic ion exchange resins, [e.g., $N(R')_4^+$ (where R' is independently H or C_{1-4} alkyl, e.g., ammonium, Tris)], for example, isopropylamine, trimethylamine, diethylamine, triethylamine, tripropylamine, ethanolamine, 2-diethylaminoethanol, trimethamine, dicyclohexylamine, lysine, arginine, histidine, caffeine, procaine, hydrabamine, choline, betaine, ethylenediamine, glucosamine, methylglucamine, theobromine, purines, piperazine, piperidine, N-ethylpiperidine, polyamine resins and the like. Particularly preferred organic non-toxic bases are isopropylamine, diethylamine, ethanolamine, trimethamine, dicyclohexylamine, choline, and caffeine.

Additional pharmaceutically acceptable acids and bases useable with the present invention include those which are derived from the amino acids, for example, histidine, glycine, phenylalanine, aspartic acid, glutamic acid, lysine and asparagine.

"Pharmaceutically acceptable" buffers and salts include those derived from both acid and base addition salts of the above indicated acids and bases. Specific buffers and or salts include histidine, succinate and acetate.

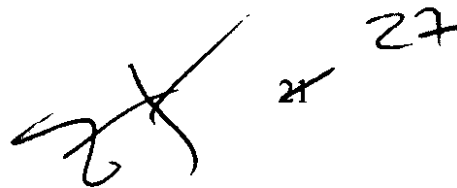


A "lyoprotectant" is a molecule which, when combined with a protein of interest, significantly prevents or reduces chemical and/or physical instability of the protein upon lyophilization and subsequent storage. Exemplary lyoprotectants include sugars and their corresponding sugar alcohols; an amino acid such as monosodium glutamate or histidine; a methylamine such as betaine; a lyotropic salt such as magnesium sulfate; a polyol such as trihydric or higher molecular weight sugar alcohols, *e.g.* glycerin, dextran, erythritol, glycerol, arabitol, xylitol, sorbitol, and mannitol; propylene glycol; polyethylene glycol; Pluronic®; and combinations thereof. Additional exemplary lyoprotectants include glycerin and gelatin, and the sugars mellibiose, melezitose, raffinose, mannotriose and stachyose. Examples of reducing sugars include glucose, maltose, lactose, maltulose, iso-maltulose and lactulose. Examples of non-reducing sugars include non-reducing glycosides of polyhydroxy compounds selected from sugar alcohols and other straight chain polyalcohols. Preferred sugar alcohols are monoglycosides, especially those compounds obtained by reduction of disaccharides such as lactose, maltose, lactulose and maltulose. The glycosidic side group can be either glucosidic or galactosidic. Additional examples of sugar alcohols are glucitol, maltitol, lactitol and iso-maltulose. The preferred lyoprotectant are the non-reducing sugars trehalose or sucrose.

The lyoprotectant is added to the pre-lyophilized formulation in a "lyoprotecting amount" which means that, following lyophilization of the protein in the presence of the lyoprotecting amount of the lyoprotectant, the protein essentially retains its physical and chemical stability and integrity upon lyophilization and storage.

In preparing the reduced viscosity formulations of the invention, care should be taken using the above enumerated excipients as well as other additives, especially when added at high concentration, so as to not increase the viscosity of the formulation.

A "pharmaceutically acceptable sugar" is a molecule which, when combined with a protein of interest, significantly prevents or reduces chemical and/or physical instability of the protein upon storage. When the formulation is intended to be lyophilized and then reconstituted, "pharmaceutically acceptable sugars" may also be



known as a "lyoprotectant". Exemplary sugars and their corresponding sugar alcohols includes: an amino acid such as monosodium glutamate or histidine; a methylamine such as betaine; a lyotropic salt such as magnesium sulfate; a polyol such as trihydric or higher molecular weight sugar alcohols, *e.g.* glycerin, dextran, erythritol, glycerol, arabitol, xylitol, sorbitol, and mannitol; propylene glycol; polyethylene glycol; Pluronic®; and combinations thereof. Additional exemplary lyoprotectants include glycerin and gelatin, and the sugars mellibiose, melezitose, raffinose, mannotriose and stachyose. Examples of reducing sugars include glucose, maltose, lactose, maltulose, iso-maltulose and lactulose. Examples of non-reducing sugars include non-reducing glycosides of polyhydroxy compounds selected from sugar alcohols and other straight chain polyalcohols. Preferred sugar alcohols are monoglycosides, especially those compounds obtained by reduction of disaccharides such as lactose, maltose, lactulose and maltulose. The glycosidic side group can be either glucosidic or galactosidic. Additional examples of sugar alcohols are glucitol, maltitol, lactitol and iso-maltulose. The preferred pharmaceutically-acceptable sugars are the non-reducing sugars trehalose or sucrose.

Pharmaceutically acceptable sugars are added to the formulation in a "protecting amount" (*e.g.* pre-lyophilization) which means that the protein essentially retains its physical and chemical stability and integrity during storage (*e.g.*, after reconstitution and storage).

The "diluent" of interest herein is one which is pharmaceutically acceptable (safe and non-toxic for administration to a human) and is useful for the preparation of a liquid formulation, such as a formulation reconstituted after lyophilization. Exemplary diluents include sterile water, bacteriostatic water for injection (BWFI), a pH buffered solution (*e.g.* phosphate-buffered saline), sterile saline solution, Ringer's solution or dextrose solution. In an alternative embodiment, diluents can include aqueous solutions of salts and/or buffers.

A "preservative" is a compound which can be added to the formulations herein to reduce bacterial activity. The addition of a preservative may, for example, facilitate the production of a multi-use (multiple-dose) formulation. Examples of potential preservatives include octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride, hexamethonium chloride, benzalkonium chloride (a mixture of

alkylbenzyltrimethylammonium chlorides in which the alkyl groups are long-chain compounds), and benzethonium chloride. Other types of preservatives include aromatic alcohols such as phenol, butyl and benzyl alcohol, alkyl parabens such as methyl or propyl paraben, catechol, resorcinol, cyclohexanol, 3-pentanol, and *m*-cresol. The most preferred preservative herein is benzyl alcohol.

"Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those in which the disorder is to be prevented.

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, horses, rabbits, cattle, pigs, hamsters, gerbils, mice, ferrets, rats, cats, *etc.* Preferably, the mammal is human.

A "disorder" is any condition that would benefit from treatment with the protein. This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question. Non-limiting examples of disorders to be treated herein include carcinomas and allergies.

A "therapeutically effective amount" is at least the minimum concentration required to effect a measurable improvement or prevention of a particular disorder. Therapeutically effective amounts of known proteins are well known in the art, while the effective amounts of proteins hereinafter discovered may be determined by standard techniques which are well within the skill of a skilled artisan, such as an ordinary physician.

"Viscosity" as used herein may be "kinematic viscosity" or "absolute viscosity." "Kinematic viscosity" is a measure of the resistive flow of a fluid under the influence of gravity. When two fluids of equal volume are placed in identical capillary viscometers and allowed to flow by gravity, a viscous fluid takes longer than a less viscous fluid to flow through the capillary. If one fluid takes 200 seconds to complete its flow and another fluid takes 400 seconds, the second fluid is twice as viscous as the first on a kinematic viscosity scale. "Absolute viscosity", sometimes called dynamic or simple viscosity, is the product of kinematic viscosity and fluid density:

$$\text{Absolute Viscosity} = \text{Kinematic Viscosity} \times \text{Density}$$

The dimension of kinematic viscosity is L^2/T where L is a length and T is a time. Commonly, kinematic viscosity is expressed in centistokes (cSt). The SI unit of kinematic viscosity is mm^2/s , which is 1 cSt. Absolute viscosity is expressed in units of centipoise (cP). The SI unit of absolute viscosity is the milliPascal-second (mPa-s), where 1 cP = 1 mPa-s.

An "antihistamine" as used herein is an agent that antagonizes the physiological effect of histamine. The binding of histamine to its receptors, H_1 and H_2 results in the characteristic allergic symptoms and effects or itching, redness, swelling *etc.* Many antihistamines act by blocking the binding of histamine to its receptors, H_1 , H_2 ; however others are believed to operate by inhibiting the release of histamine. Examples of antihistamines are chlorpheniramine, diphenhydramine, promethazine, cromolyn sodium, astemizole, azatadine maleate, bropheniramine maleate, carbinoxamine maleate, cetirizine hydrochloride, clemastine fumarate, cyproheptadine hydrochloride, dexbrompheniramine maleate, dexchlorpheniramine maleate, dimenhydrinate, diphenhydramine hydrochloride, doxylamine succinate, fexofenadine hydrochloride, terphenadine hydrochloride, hydroxyzine hydrochloride, loratidine, meclizine hydrochloride, tripelannamine citrate, tripelennamine hydrochloride, triprolidine hydrochloride.

A "bronchodilator" as used herein, describes agents that antagonizes or reverses bronchoconstriction, a physiological event that occurs typically in early phase asthmatic reactions resulting in decreased lung capacity and shortness of breadth. Example bronchodilators include epinephrine, a broad acting alpha and beta-adrenergic, and the beta-adrenergics albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol, and isoetharine. Bronchodilation can also be achieved through administration of xanthines, including aminophylline and theophylline.

A "glucocorticoid" as used herein describes steroidal based agents having anti-inflammatory activity. Glucocorticoid are commonly used to attenuate late phase asthmatic reaction. Example glucocorticoids include, prednisone, beclomethasone dipropionate, triamcinolone acetonide, flunisolide, betamethasone, budesonide, dexamethasone, fludrocortisone acetate, flunisolide, fluticasone

230 24

propionate, hydrocortisone, methylprednisolone, prednisolone, prednisone and triamcinolone.

A "non-steroidal anti-inflammatory drug" or "NSAID", as used herein describes agents having anti-inflammatory activity that are not steroidal based.

- 5 Example NSAID's include acetaminophen, aspirin, bromfenac sodium, diclofenac sodium, diflunisal, etodolac, fenoprofen calcium, flurbiprofen, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, meclofenamate sodium, mefenamic acid, nabumetone, naproxen, naproxen sodium, oxyphenbutazone, phenylbutzone, piroxicam, sulindac, tolmetin sodium.

10

II. Modes for Carrying out the Invention

A. Polypeptide and Antibody Preparation

- The following description relates primarily to production of the polypeptides or antibodies described herein by culturing cells transformed or transfected with a
- 15 vector containing nucleic acid encoding the same and purification of the resulting protein or antibody. It is, of course, contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare such polypeptides or antibodies. For instance, such sequences, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques [see, e.g., Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide*
- 20 *Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)]. *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the proteins or antibodies described
- 25 herein may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods.

31

25

1. Isolation of DNA encoding the proteins described herein

DNA encoding the proteins described herein may be obtained from a cDNA library prepared from tissue believed to possess the corresponding mRNA and to express it at a detectable level. Accordingly, such human protein-encoding DNA can be conveniently obtained from a cDNA library prepared from human tissue, such as described in the Examples. The protein-encoding gene may also be obtained from a genomic library or by known synthetic procedures (e.g., automated nucleic acid synthesis).

Libraries can be screened with probes (such as oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). An alternative means to isolate the gene encoding the desired gene is to use PCR methodology [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

The Examples below describe techniques for screening a cDNA library. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of radiolabels like ^{32}P -labeled ATP, biotinylation or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook *et al.*, *supra*.

Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as Genbank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the full-length sequence can be determined using methods known in the art and as described herein.

Nucleic acid having protein coding sequence may be obtained by screening selected cDNA or genomic libraries using the deduced amino acid sequence disclosed

32

~~32~~

32

~~32~~

32

~~32~~

32

~~32~~

Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) and Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325) and K5 772 (ATCC 53,635). Other suitable prokaryotic host cells include Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescans*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. These examples are illustrative rather than limiting. Strain W3110 is one particularly preferred host or parent host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentations. Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic enzymes. For example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding proteins endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA*; *E. coli* W3110 strain 9E4, which has the complete genotype *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, e.g., PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for vectors encoding the proteins or antibodies described herein. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach

and Nurse, *Nature*, 290:140 [1981]; EP 139,383 published 2 May 1985); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) such as, e.g., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 154(2): 737-42 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906; Van den Berg *et al.*, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) and *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Methylotropic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*. A list of specific species that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

Suitable host cells for the expression of glycosylated form of the polypeptides and antibodies described herein are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9, as well as plant cells. Examples of useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) and COS cells. More specific examples include monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); and mouse mammary

35 28 35

tumor (MMT 060562, ATCC CCL51). The selection of the appropriate host cell is deemed to be within the skill in the art.

3. Selection and Use of a Replicable Vector

5 The nucleic acid (e.g., cDNA or genomic DNA) encoding the polypeptides and antibodies described herein may be inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted into the vector by a
10 variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one
15 or more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

Recombinant production of the polypeptides or antibodies may be accomplished not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide. The heterologous portion may be a signal sequence or other polypeptide
20 having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the DNA encoding the polypeptide or antibody that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II
25 leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α -factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader (EP 362,179 published 4 April 1990), or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell
30 expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.



Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2 μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, *e.g.*, ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, *e.g.*, the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the DNA sequence encoding the polypeptides or antibodies described herein, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7 [Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene*, 10:157 (1980)]. The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the such DNA sequences to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the β -lactamase and lactose promoter systems [Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)], alkaline phosphatase, a tryptophan (*trp*) promoter system [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776], and hybrid promoters such as the *tac* promoter [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promoters for use in bacterial

systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to such DNA sequences.

Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase [Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] or other glycolytic enzymes [Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.

Transcription from vectors in mammalian host cells may be controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, *e.g.*, the actin promoter or an immunoglobulin promoter, and from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

Transcription of nucleic acid encoding the polypeptides or antibodies herein by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are *cis*-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of

the replication origin, and adenovirus enhancers. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the coding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding the polypeptides or antibodies described herein.

Still other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of the polypeptide or antibodies described herein in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

15

4. Detecting Gene Amplification/Expression

Gene amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to a surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against the polypeptides described

30

39 39

herein or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against exogenous sequence fused to DNA encoding such polypeptides and antibodies and encoding a specific antibody epitope.

5 5. Purification of Polypeptide

Forms of may be recovered from culture medium or from host cell lysates. If membrane-bound, it can be released from the membrane using a suitable detergent solution (*e.g.* Triton-X 100) or by enzymatic cleavage. Cells employed in expression of the polypeptides or antibodies described herein can be disrupted by various physical or chemical means, such as freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or cell lysing agents.

It may be desired to purify the polypeptides or antibodies described herein from recombinant cell proteins or other polypeptides. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: by fractionation on an ion-exchange column; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation; gel filtration using, for example, Sephadex G-75; protein A Sepharose columns to remove contaminants such as IgG; and metal chelating columns to bind epitope-tagged forms of the polypeptide or antibody. Various methods of protein purification may be employed and such methods are known in the art and described for example in Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). The purification step(s) selected will depend, for example, on the nature of the production process used and the particular polypeptide or antibody produced.

25

B. Antibody preparation

In certain embodiments of the invention, the protein of choice is an antibody. Techniques for the production of antibodies, including polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific and heteroconjugate antibodies follow.

30

1) *Polyclonal antibodies.*

Polyclonal antibodies are generally raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) injections of the relevant antigen and an adjuvant. It may be useful to conjugate the relevant antigen to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, *e.g.*, keyhole limpet hemocyanin (KLH), serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor, using a bifunctional or derivatizing agent, *e.g.*, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, SOCl_2 , or $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, where R and R^1 are independently lower alkyl groups. Examples of adjuvants which may be employed include Freund's complete adjuvant and MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate). The immunization protocol may be selected by one skilled in the art without undue experimentation.

The animals are immunized against the antigen, immunogenic conjugates, or derivatives by combining, *e.g.*, 100 μg or 5 μg of the protein or conjugate (for rabbits or mice, respectively) with 3 volumes of Freund's complete adjuvant and injecting the solution intradermally at multiple sites. One month later, the animals are boosted with 1/5 to 1/10 the original amount of peptide or conjugate in Freund's complete adjuvant by subcutaneous injection at multiple sites. Seven to fourteen days later, the animals are bled and the serum is assayed for antibody titer. Animals are boosted until the titer plateaus. Conjugates also can be made in recombinant cell culture as protein fusions. Also, aggregating agents such as alum are suitable used to enhance the immune response.

2) *Monoclonal antibodies.*

Monoclonal antibodies are obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations and/or post-translational modifications (*e.g.*, isomerizations, amidations) that may be present in minor amounts. Thus, the modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as not being a mixture of discrete antibodies.

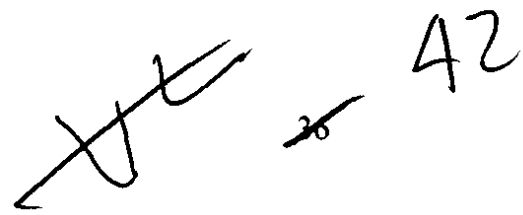
For example, the monoclonal antibodies may be made using the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (U.S. Patent No. 4,816,567).

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster, is immunized as hereinabove described to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. Lymphocytes then are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

The immunizing agent will typically include the antigenic protein or a fusion variant thereof. Generally either peripheral blood lymphocytes ("PBLs") are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103.

Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cell, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Among these, preferred are murine myeloma lines, such as those derived from MOPC-21 and MPC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 cells (and derivatives thereof, e.g., X63-Ag8-653) available from the



American Type Culture Collection, Manassus, Virginia USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against desired antigen. Preferably, the binding affinity and specificity of the monoclonal antibody can be determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. For example, binding affinity may be determined by the Scatchard analysis of Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *supra*). Suitable culture media for this purpose include, for example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in a mammal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

Monoclonal antibodies may also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567, and as described above. DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once

isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, in order to synthesize monoclonal antibodies in such recombinant host cells. Review articles on recombinant expression in bacteria of DNA encoding the antibody include
5 Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) and Plückthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

In a further embodiment, antibodies can be isolated from antibody phage libraries generated using the techniques described in McCafferty *et al.*, *Nature*,
10 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describe the isolation of murine and human antibodies, respectively, using phage libraries. Subsequent publications describe the production of high affinity (nM range) human antibodies by chain shuffling (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), as well as combinatorial infection and *in vivo* recombination as a strategy for constructing very large phage libraries
15 (Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Thus, these techniques are viable alternatives to traditional monoclonal antibody hybridoma techniques for isolation of monoclonal antibodies.

The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding
20 sequence for human heavy- and light-chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Typically such non-immunoglobulin polypeptides are
25 substituted for the constant domains of an antibody, or they are substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody to create a chimeric bivalent antibody comprising one antigen-combining site having specificity for an antigen and another antigen-combining site having specificity for a different antigen.

The monoclonal antibodies described herein may be monovalent, the
30 preparation of which is well known in the art. For example, one method involves recombinant expression of immunoglobulin light chain and a modified heavy chain. The heavy chain is truncated generally at any point in the Fc region so as to prevent

44 38 44

heavy chain crosslinking. Alternatively, the relevant cysteine residues may be substituted with another amino acid residue or are deleted so as to prevent crosslinking. *In vitro* methods are also suitable for preparing monovalent antibodies. Digestion of antibodies to produce fragments thereof, particularly Fab fragments, can be accomplished using routine techniques known in the art.

Chimeric or hybrid antibodies also may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide-exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptopbutyrimidate.

3) Humanized antibodies.

The antibodies of the invention may further comprise humanized or human antibodies. Humanized forms of non-human (*e.g.*, murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Humanized antibodies include human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementarity determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies may also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domain, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988) and Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988), or through substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework (FR) for the humanized antibody. Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987). Another method uses a particular framework derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies. Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993).

It is further important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar

to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the CDR residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

Various forms of the humanized antibody are contemplated. For example, the humanized antibody may be an antibody fragment, such as an Fab, which is optionally conjugated with one or more cytotoxic agent(s) in order to generate an immunoconjugate. Alternatively, the humanized antibody may be an intact antibody, such as an intact IgG1 antibody.

4) *Human antibodies*

As an alternative to humanization, human antibodies can be generated. For example, it is now possible to produce transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (J_H) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge. See, *e.g.*, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); U.S. Patent Nos. 5,591,669 and WO 97/17852.

Alternatively, phage display technology can be used to produce human antibodies and antibody fragments in vitro, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991). According to this

technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B-cell. Phage display can be performed in a variety of formats, reviewed in, e.g., Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:564-571 (1993). Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), or Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). See also, U.S. Patent. Nos. 5,565,332 and 5,573,905.

The techniques of Cole *et al.*, and Boerner *et al.*, are also available for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner *et al.*, *J. Immunol.* 147(1): 86-95 (1991). Similarly, human antibodies can be made by introducing human immunoglobulin loci into transgenic animals, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in human in all respects, including gene rearrangement, assembly and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806, 5,569,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016 and in the following scientific publications: Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994), Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996), Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996) and Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Finally, human antibodies may also be generated in vitro by activated B cells (see U.S. Patent Nos 5,567,610 and 5,229,275).

48
42

5) Antibody Fragments

In certain circumstances there are advantages to using antibody fragments, rather than whole antibodies. Smaller fragment sizes allows for rapid clearance, and
5 may lead to improved access to solid tumors.

Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, e.g., Morimoto *et al.*, *J Biochem Biophys. Method.* 24:107-117 (1992); and Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). However, these fragments can
10 now be produced directly by recombinant host cells. Fab, Fv and scFv antibody fragments can all be expressed in and secreted from *E. coli*, thus allowing the facile production of large amounts of these fragments. Antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed above. Alternatively, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form F(ab')₂
15 fragments (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). According to another approach, F(ab')₂ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Fab and F(ab')₂ with increase in vivo half-life is described in U.S. Patent No. 5,869,046. In other embodiments, the antibody of choice is a single chain Fv fragment (scFv). See WO 93/16185; U.S. Patent No. 5,571,894 and U.S. Patent No.
20 5,587,458. The antibody fragment may also be a "linear antibody", e.g., as described in U.S. Patent 5,641,870. Such linear antibody fragments may be monospecific or bispecific.

6) Antibody Dependent Enzyme-Mediated Prodrug Therapy (ADEPT)

25

The antibodies of the present invention may also be used in ADEPT by conjugating the antibody to a prodrug-activating enzyme which converts a prodrug (e.g. a peptidyl chemotherapeutic agent, see WO 81/01145) to an active anti-cancer drug. See, for example, WO 88/07378 and U. S. Patent No. 4,975,278.

30 The enzyme component of the immunoconjugate useful for ADEPT includes any enzyme capable of acting on a prodrug in such a way so as to convert it into its more active, cytotoxic form.

Enzymes that are useful in the method of this invention include, but are not limited to, glycosidase, glucose oxidase, human lysozyme, human glucuronidase, alkaline phosphatase useful for converting phosphate-containing prodrugs into free drugs; arylsulfatase useful for converting sulfate-containing prodrugs into free drugs; cytosine deaminase useful for converting non-toxic 5-fluorocytosine into the anti-cancer drug 5-fluorouracil; proteases, such as serratia protease, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidases (*e.g.*, carboxypeptidase G2 and carboxypeptidase A) and cathepsins (such as cathepsins B and L), that are useful for converting peptide-containing prodrugs into free drugs; D-alanylcarboxypeptidases, useful for converting prodrugs that contain D-amino acid substituents; carbohydrate-cleaving enzymes such as β -galactosidase and neuraminidase useful for converting glycosylated prodrugs into free drugs; β -lactamase useful for converting drugs derivatized with β -lactams into free drugs; and penicillin amidases, such as penicillin Vamidase or penicillin G amidase, useful for converting drugs derivatized at their amine nitrogens with phenoxyacetyl or phenylacetyl groups, respectively, into free drugs. Alternatively, antibodies with enzymatic activity, also known in the art as "abzymes" can be used to convert the prodrugs of the invention into free active drugs (see, *e.g.*, Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Antibody-abzyme conjugates can be prepared as described herein for delivery of the abzyme to a tumor cell population.

The above enzymes can be covalently bound to the polypeptide or antibodies described herein by techniques well known in the art such as the use of the heterobifunctional cross-linking agents discussed above. Alternatively, fusion proteins comprising at least the antigen binding region of the antibody of the invention linked to at least a functionally active portion of an enzyme of the invention can be constructed using recombinant DNA techniques well known in the art (see, *e.g.* Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604-608 (1984)).

7) *Bispecific and polyspecific antibodies*

Bispecific antibodies (BsAbs) are antibodies that have binding specificities for at least two different epitopes, including those on the same or another protein. Alternatively, one arm can be armed to bind to the target antigen, and another arm can be combined with an arm that binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a

T-cell receptor molecule (e.g., CD3), or Fc receptors for IgG (FcγR) such as FcγR1 (CD64), FcγR2 (CD32) and FcγR3 (CD16), so as to focus and localize cellular defense mechanisms to the target antigen-expressing cell. Such antibodies can be derived from full length antibodies or antibody fragments (e.g. F(ab')₂ bispecific antibodies).

Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express the target antigen. Such antibodies possess one arm that binds the desired antigen and another arm that binds the cytotoxic agent (e.g., saporin, anti-interferon-α, vinca alkaloid, ricin A chain, methotrexate or radioactive isotope hapten). Examples of known bispecific antibodies include anti-ErbB2/anti-FcγR3 (WO 96/16673), anti-ErbB2/anti-FcγR1 (U.S.P. 5,837,234), anti-ErbB2/anti-CD3 (U.S.P. 5,821,337).

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditional production of full length bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two chains have different specificities. Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829 and in Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

According to a different approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments

51

when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecules provides for an easy way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690. For further details of generating bispecific antibodies, see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

According to another approach described in WO 96/27011 or U.S.P. 5,731,168, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g., tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chains(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g., alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')₂ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation.

52

The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

- 5 Fab' fragments may be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describes the production of fully humanized bispecific antibody F(ab')₂ molecules. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody
10 thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

- Various techniques for making and isolating bivalent antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example,
15 bivalent heterodimers have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. The "diabody"
20 technology described by Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific/bivalent antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L
25 domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific/bivalent antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

- 30 Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes on a given molecule. Alternatively, an anti-protein arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g., CD2, CD3, CD28 or B7), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular protein. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express a particular protein. Such antibodies possess a protein-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the protein of interest and further binds tissue factor (TF).

6) *Heteroconjugate Antibodies*

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells, U.S.P. 4,676,980, and for treatment of HIV infection. WO 91/00360, WO 92/200373 and EP 0308936. It is contemplated that the antibodies may be prepared in vitro using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980. Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in US Patent No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

7) *Effector Function Engineering*

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance the effectiveness of the antibody in treating cancer. For example, cysteine residue(s) may be introduced into the Fc region, thereby

54
48

allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) and
5 Shopes, *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al.*, *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug*
10 *Design* 3: 219-230 (1989).

8) Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (*e.g.*, an
15 enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates include BCNU, streptozocin, vincristine, vinblastine, adriamycin and 5-fluorouracil.

Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include
20 diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolaca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin,
25 enomycin, and the tricothecenes.

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate),
30 aldehydes (such as glutarelddehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-

diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026. The linker may be a "cleavable linker" facilitating release of the cytotoxic drug in the cell. For example, an acid-labile linker, peptidase-sensitive linker, dimethyl linker or disulfide-containing linker (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992)) may be used.

10 Additionally, the small molecule toxins such as calicheamicin, maytansine (U.S.P. 5,208,020), trichothene and CC1065 are also contemplated as conjugatable toxins for use with the inventive formulation. In one embodiment the full length antibody or antigen binding fragments thereof can be conjugated to one or more maytansinoid molecules (e.g., about 1 to about 10 maytansinoid molecules per
15 antibody molecule). Maytansinoids are mitototic inhibitors which act by inhibiting tubulin polymerization. Maytansinoids, isolated from natural sources or prepared synthetically, including maytansine, maytansinal and derivatives and analogues thereof have been described, see e.g., U.S. Patent No. 5,208,020 and references cited therein (see col. 2, line 53 to col. 3, line 10) and U.S. Patents 3,896,111 and
20 4,151,042. Method of preparing antibody-maytansinoid conjugates are also described in U.S. Pat. No. 5,208,020. In a preferred embodiment, a maytansinoid is linked to the antibody via a disulfide or other sulfur-containing linker group. Maytansine may, for example, be converted to May-SS-Me, which may be reduced to May-SH₃ and reacted with modified antibody to generate a maytansinoid-antibody
25 immunoconjugate. Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992). The antibody can be modified by known methods and the antibody containing free or protected thiol groups is then reacted with a disulfide containing maytansinoid to produce the conjugate. The cytotoxicity of the antibody-maytansinoid conjugate can be measured *in vitro* or *in vivo* by known methods and the IC₅₀ determined.

30 Calicheamicin is another immunoconjugate of interest. The calicheamicin family of antibiotics are capable of producing double-stranded DNA breaks at sub-picomolar concentrations. Structural analogues of calicheamicin which may be used

56

include, but are not limited to, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-aceetyl- γ_1^1 , PSAG and θ^1 (Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993) and Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)). Other anti-tumor drugs that the antibody can be conjugated to include QFA which is an antifolate. Both calicheamicin and QFA have intracellular sites of actions and do not readily cross the plasma membrane. Therefore, cellular uptake of these agents through antibody mediated internalization greatly enhances their cytotoxic effects.

Immunoconjugates formed between an antibody and a compound with nucleolytic activity (e.g., a ribonuclease or DNA endonuclease such as deoxyribonuclease, DNase) are also contemplated.

The antibody may also be conjugated to a highly radioactive atom. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include At^{211} , Bi^{212} , I^{131} , In^{131} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , P^{32} and Pb^{212} and radioactive isotopes of Lu. When the conjugate is used for diagnosis, it may comprise a radioactive atom for scintigraphic studies, for example Tc^{99} or I^{123} , or a spin label for nuclear magnetic resonance (nmr) imaging (also known as magnetic resonance imaging, mri), such as iodine-123, iodine-131, indium-111, fluorine-19, carbon-13, nitrogen-15, oxygen-17, gadolinium, manganese or iron.

The radio- or other labels may be incorporated in the conjugate in known ways. For example, the peptide may be biosynthesized or may be synthesized by chemical amino acid synthesis using suitable amino acid precursors involving, for example, fluorine-19 in place of hydrogen. Labels such Tc^{99} or I^{123} , Re^{186} , Re^{188} and In^{111} can be attached via a cysteine residue in the peptide. Yttrium-90 can be attached via a lysine residue. The IODOGEN® method can be used to incorporate iodine-123, Fraker et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57 (1978). Other methods of conjugating radionuclides are described in "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy," (Chatal, CRC Press 1989).

Alternatively, a fusion protein comprising the antibody and the cytotoxic agent may be made by recombinant techniques or peptide synthesis. The length of DNA may comprise respective regions encoding the two portions of the conjugate either adjacent to one another or separated by a region encoding a linker peptide which does not destroy the desired properties of the conjugate.

In another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g.,
5 avidin) that is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionucleotide).

9) Immunoliposomes

The antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids
10 and/or surfactant which is useful for delivery of a drug to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985);
15 Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse-phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine,
20 cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) via a disulfide-interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is
25 optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

10) Other Antibody Modifications

Other modifications of the antibody are contemplated herein. For example,
30 the antibody may be linked to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyoxyalkylenes, or copolymers of polyethylene glycol and polypropylene glycol. The antibody also may be entrapped

in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization (for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively), in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nanoparticles and nanocapsules), or in macroemulsions. Such techniques and other suitable formulations are disclosed in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

10 C. Lyophilized Formulations

The formulations described herein may also be prepared as reconstituted lyophilized formulations. The proteins or antibodies described herein are lyophilized and then reconstituted to produce the reduced-viscosity stable liquid formulations of the invention. In this particular embodiment, after preparation of the protein of interest as described above, a "pre-lyophilized formulation" is produced. The amount of protein present in the pre-lyophilized formulation is determined taking into account the desired dose volumes, mode(s) of administration *etc.* For example, the starting concentration of an intact antibody can be from about 2 mg/ml to about 50 mg/ml, preferably from about 5 mg/ml to about 40 mg/ml and most preferably from about 20-30 mg/ml.

1) Preparation of Lyophilized Formulations

The protein to be formulated is generally present in solution. For example, in the elevated ionic strength reduced viscosity formulations of the invention, the protein may be present in a pH-buffered solution at a pH from about 4-8, and preferably from about 5-7. The buffer concentration can be from about 1 mM to about 20 mM, alternatively from about 3 mM to about 15 mM, depending, for example, on the buffer and the desired tonicity of the formulation (*e.g.* of the reconstituted formulation). Exemplary buffers and/or salts are those which are pharmaceutically acceptable and may be created from suitable acids, bases and salts thereof, such as those which are defined under "pharmaceutically acceptable" acids, bases or buffers.

In one embodiment, a lyoprotectant is added to the pre-lyophilized formulation. The amount of lyoprotectant in the pre-lyophilized formulation is

generally such that, upon reconstitution, the resulting formulation will be isotonic. However, hypertonic reconstituted formulations may also be suitable. In addition, the amount of lyoprotectant must not be too low such that an unacceptable amount of degradation/aggregation of the protein occurs upon lyophilization. However, 5 exemplary lyoprotectant concentrations in the pre-lyophilized formulation are from about 10 mM to about 400 mM, alternatively from about 30 mM to about 300 mM, alternatively from about 50 mM to about 100 mM. Exemplary lyoprotectants include sugars and sugar alcohols such as sucrose, mannose, trehalose, glucose, sorbitol, mannitol. However, under particular circumstances, certain lyoprotectants may also 10 contribute to an increase in viscosity of the formulation. As such, care should be taken so as to select particular lyoprotectants which minimize or neutralize this effect. Additional lyoprotectants are described above under the definition of "lyoprotectants", also referred herein as "pharmaceutically-acceptable sugars".

The ratio of protein to lyoprotectant can vary for each particular protein or 15 antibody and lyoprotectant combination. In the case of an antibody as the protein of choice and a sugar (*e.g.*, sucrose or trehalose) as the lyoprotectant for generating an isotonic reconstituted formulation with a high protein concentration, the molar ratio of lyoprotectant to antibody may be from about 100 to about 1500 moles lyoprotectant to 1 mole antibody, and preferably from about 200 to about 1000 moles 20 of lyoprotectant to 1 mole antibody, for example from about 200 to about 600 moles of lyoprotectant to 1 mole antibody.

In a preferred embodiment, it may be desirable to add a surfactant to the pre-lyophilized formulation. Alternatively, or in addition, the surfactant may be added to the lyophilized formulation and/or the reconstituted formulation. Exemplary 25 surfactants include nonionic surfactants such as polysorbates (*e.g.* polysorbates 20 or 80); polyoxamers (*e.g.* poloxamer 188); Triton; sodium octyl glycoside; lauryl-, myristyl-, linoleyl-, or stearyl-sulfobetaine; lauryl-, myristyl-, linoleyl- or stearyl-sarcosine; linoleyl-, myristyl-, or cetyl-betaine; lauroamidopropyl-, cocamidopropyl-, linoleamidopropyl-, myristamidopropyl-, palmidopropyl-, or isostearamidopropyl- 30 betaine (*e.g.* lauroamidopropyl); myristamidopropyl-, palmidopropyl-, or isostearamidopropyl-dimethylamine; sodium methyl cocoyl-, or disodium methyl oleyl-taurate; and the MONAQUA™ series (Mona Industries, Inc., Paterson, New

Jersey), polyethyl glycol, polypropyl glycol, and copolymers of ethylene and propylene glycol (e.g. Pluronic, PF68 etc). The amount of surfactant added is such that it reduces particulate formation of the reconstituted protein and minimizes the formation of particulates after reconstitution. For example, the surfactant may be
5 present in the pre-lyophilized formulation in an amount from about 0.001-0.5%, alternatively from about 0.005-0.05%.

A mixture of the lyoprotectant (such as sucrose or trehalose) and a bulking agent (e.g. mannitol or glycine) may be used in the preparation of the pre-lyophilization formulation. The bulking agent may allow for the production of a
10 uniform lyophilized cake without excessive pockets therein etc. Other pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers such as those described in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) may be included in the pre-lyophilized formulation (and/or the lyophilized formulation and/or the reconstituted formulation) provided that they do not adversely affect the desired
15 characteristics of the formulation. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed and include; additional buffering agents; preservatives; co-solvents; antioxidants including ascorbic acid and methionine; chelating agents such as EDTA; metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); biodegradable polymers such as polyesters; and/or salt-
20 forming counterions such as sodium.

The formulation herein may also contain more than one protein as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect the other protein. For example, it may be desirable to provide two or more antibodies which bind to the desired target (e.g.,
25 receptor or antigen) in a single formulation. Such proteins are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes, prior to, or following, lyophilization and reconstitution. Alternatively, sterility of the entire
30 mixture may be accomplished by autoclaving the ingredients, except for protein, at about 120°C for about 30 minutes, for example.

After the protein, optional lyoprotectant and other optional components are mixed together, the formulation is lyophilized. Many different freeze-dryers are available for this purpose such as Hull50™ (Hull, USA) or GT20™ (Leybold-Heraeus, Germany) freeze-dryers. Freeze-drying is accomplished by freezing the formulation and subsequently subliming ice from the frozen content at a temperature suitable for primary drying. Under this condition, the product temperature is below the eutectic point or the collapse temperature of the formulation. Typically, the shelf temperature for the primary drying will range from about -30 to 25°C (provided the product remains frozen during primary drying) at a suitable pressure, ranging typically from about 50 to 250 mTorr. The formulation, size and type of the container holding the sample (e.g., glass vial) and the volume of liquid will mainly dictate the time required for drying, which can range from a few hours to several days (e.g. 40-60 hrs). Optionally, a secondary drying stage may also be performed depending upon the desired residual moisture level in the product. The temperature at which the secondary drying is carried out ranges from about 0-40°C, depending primarily on the type and size of container and the type of protein employed. For example, the shelf temperature throughout the entire water removal phase of lyophilization may be from about 15-30°C (e.g., about 20°C). The time and pressure required for secondary drying will be that which produces a suitable lyophilized cake, dependent, e.g., on the temperature and other parameters. The secondary drying time is dictated by the desired residual moisture level in the product and typically takes at least about 5 hours (e.g. 10-15 hours). The pressure may be the same as that employed during the primary drying step. Freeze-drying conditions can be varied depending on the formulation and vial size.

25

2. Reconstitution of a Lyophilized Formulation

Prior to administration to the patient, the lyophilized formulation is reconstituted with a pharmaceutically acceptable diluent such that the protein concentration in the reconstituted formulation is at least about 50 mg/ml, for example from about 50 mg/ml to about 400 mg/ml, alternatively from about 80 mg/ml to about 300 mg/ml, alternatively from about 90 mg/ml to about 150 mg/ml. Such high protein concentrations in the reconstituted formulation are considered to be

30

particularly useful where subcutaneous delivery of the reconstituted formulation is intended. However, for other routes of administration, such as intravenous administration, lower concentrations of the protein in the reconstituted formulation may be desired (for example from about 5-50 mg/ml, or from about 10-40 mg/ml protein in the reconstituted formulation). In certain embodiments, the protein concentration in the reconstituted formulation is significantly higher than that in the pre-lyophilized formulation. For example, the protein concentration in the reconstituted formulation may be about 2-40 times, alternatively 3-10 times, alternatively 3-6 times (*e.g.* at least three fold or at least four fold) that of the pre-lyophilized formulation.

Reconstitution generally takes place at a temperature of about 25°C to ensure complete hydration, although other temperatures may be employed as desired. The time required for reconstitution will depend, *e.g.*, on the type of diluent, amount of excipient(s) and protein. Exemplary diluents include sterile water, bacteriostatic water for injection (BWFI), a pH buffered solution (*e.g.* phosphate-buffered saline), sterile saline solution, Ringer's solution or dextrose solution. The diluent optionally contains a preservative. Exemplary preservatives have been described above, with aromatic alcohols such as benzyl or phenol alcohol being the preferred preservatives. The amount of preservative employed is determined by assessing different preservative concentrations for compatibility with the protein and preservative efficacy testing. For example, if the preservative is an aromatic alcohol (such as benzyl alcohol), it can be present in an amount from about 0.1-2.0% and preferably from about 0.5-1.5%, but most preferably about 1.0-1.2%.

Preferably, the reconstituted formulation has less than 6000 particles per vial which are $\geq 10 \mu\text{m}$ in size.

D. Liquid Formulations

Therapeutic formulations are prepared for storage by mixing the active ingredient having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 18th edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 [1990]). Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations

employed, and include buffers, antioxidants including ascorbic acid, methionine, Vitamin E, sodium metabisulfite; preservatives, isotonicifiers, stabilizers, metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); chelating agents such as EDTA and/or non-ionic surfactants.

5 When the therapeutic agent is an antibody fragment, the smallest inhibitory fragment which specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable region sequences of an antibody, antibody fragments or even peptide molecules can be designed which retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized
10 chemically and/or produced by recombinant DNA technology (see, e.g., Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7889-7893 [1993]).

 Buffers are used to control the pH in a range which optimizes the therapeutic effectiveness, especially if stability is pH dependent. Buffers are preferably present at concentrations ranging from about 50 mM to about 250 mM. Suitable buffering
15 agents for use with the present invention include both organic and inorganic acids and salts thereof. For example, citrate, phosphate, succinate, tartrate, fumarate, gluconate, oxalate, lactate, acetate. Additionally, buffers may be comprised of histidine and trimethylamine salts such as Tris.

 Preservatives are added to retard microbial growth, and are typically present
20 in a range from 0.2% - 1.0% (w/v). Suitable preservatives for use with the present invention include (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium halides (e.g., chloride, bromide, iodide), benzethonium chloride; thimerosal, phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol, 3-pentanol, and
25 *m*-cresol.

 Tonicity agents, sometimes known as "stabilizers" are present to adjust or maintain the tonicity of liquid a composition. When used with large, charged biomolecules such as proteins and antibodies, they are often termed "stabilizers" because they can interact with the charged groups of the amino acid side chains,
30 thereby lessening the potential for inter and intra-molecular interactions. Tonicity agents can be present in any amount between 0.1% to 25% by weight, preferably 1 to 5%, taking into account the relative amounts of the other ingredients. Tonicity agents

include polyhydric sugar alcohols, preferably trihydric or higher sugar alcohols, such as glycerin, erythritol, arabitol, xylitol, sorbitol and mannitol.

Additional excipients include agents which can serve as one or more of the following: (1) bulking agents, (2) solubility enhancers, (3) stabilizers and (4) agents preventing denaturation or adherence to the container wall. Stabilizers can be present in the range from 0.1 to 10,000 parts per weight active protein or antibody. Typical stabilizers include: polyhydric sugar alcohols (enumerated above); amino acids such as alanine, glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, lysine, ornithine, leucine, 2-phenylalanine, glutamic acid, threonine, *etc.*; organic sugars or sugar alcohols such as sucrose, lactose, lactitol, trehalose, stachyose, mannose, sorbose, xylose, ribose, ribitol, myoinisitol, myoinisitol, galactose, galactitol, glycerol, cyclitols (*e.g.*, inositol), polyethylene glycol; sulfur containing reducing agents, such as urea, glutathione, thiocetic acid, sodium thioglycolate, thioglycerol, α -monothioglycerol and sodium thio sulfate; low molecular weight proteins such as human serum albumin, bovine serum albumin, gelatin or other immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; monosaccharides (*e.g.*, xylose, mannose, fructose, glucose; disaccharides (*e.g.*, lactose, maltose, sucrose); trisaccharides such as raffinose; and polysaccharides such as dextrin or dextran.

Non-ionic surfactants or detergents (also known as "wetting agents") are present to help solubilize the therapeutic agent as well as to protect the therapeutic protein against agitation-induced aggregation, which also permits the formulation to be exposed to shear surface stress without causing denaturation of the active therapeutic protein or antibody. Non-ionic surfactants are present in a range of about 0.05 mg/ml to about 1.0 mg/ml, preferably about 0.07 mg/ml to about 0.2 mg/ml.

Suitable non-ionic surfactants include polysorbates (20, 40, 60, 65, 80, *etc.*), polyoxamers (184, 188, *etc.*), Pluronic[®] polyols, Triton[®], polyoxyethylene sorbitan monoethers (Tween[®]-20, Tween[®]-80, *etc.*), lauromacrogol 400, polyoxyl 40 stearate, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 10, 50 and 60, glycerol monostearate, sucrose fatty acid ester, methyl cellulose and carboxymethyl cellulose. Anionic detergents that can be used include sodium lauryl sulfate, dioctyle sodium sulfosuccinate and dioctyl sodium sulfonate. Cationic detergents include benzalkonium chloride or benzethonium chloride.

In order for the formulations to be used for *in vivo* administration, they must be sterile. The formulation may be rendered sterile by filtration through sterile filtration membranes. The therapeutic compositions herein generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial
5 having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

The route of administration is in accordance with known and accepted methods, such as by single or multiple bolus or infusion over a long period of time in a suitable manner, *e.g.*, injection or infusion by subcutaneous, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional or intraarticular routes,
10 topical administration, inhalation or by sustained release or extended-release means.

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition may comprise a cytotoxic agent, cytokine or growth
15 inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate)
20 microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18th edition, *supra*.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of
25 sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919), copolymers of L-
30 glutamic acid and γ -ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and

leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. Microencapsulation of recombinant proteins for sustained release has been successfully performed with human growth hormone (rhGH), interferon- (rhIFN-), interleukin-2, and MN rpg 120. Johnson *et al.*, *Nat. Med.* 2: 795-799 (1996); Yasuda *et al.*, *Biomed. Ther.* 27: 1221-1223 (1993); Hora *et al.*, *Bio/Technology* 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692; WO 96/40072; WO 96/07399; and U.S. Pat. No. 5,654,010.

10 The sustained-release formulations of these proteins may be developed using poly lactic-coglycolic acid (PLGA) polymer due to its biocompatibility and wide range of biodegradable properties. The degradation products of PLGA, lactic and glycolic acids, can be cleared quickly within the human body. Moreover, the degradability of this polymer can be adjusted from months to years depending on its molecular weight and composition. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", in *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker; New York, 1990), M. Chasin and R. Langer (Eds.) pp. 1-41.

While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated antibodies remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

Liposomal or proteinoid compositions may also be used to formulate the proteins or antibodies disclosed herein. See U.S. Patent Nos. 4,925,673 and 5,013,556.

Stability of the proteins and antibodies described herein may be enhanced through the use of non-toxic "water-soluble polyvalent metal salts". Examples include Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} and Al^{3+} . Example anions that can form water soluble salts with the above polyvalent metal cations include those formed from inorganic acids and/or organic acids. Such water-soluble salts have a solubility in water (at 20°C) of at least about 20 mg/ml, alternatively at least about 100 mg/ml, alternative at least about 200 mg/ml.

Suitable inorganic acids that can be used to form the "water soluble polyvalent metal salts" include hydrochloric, acetic, sulfuric, nitric, thiocyanic and phosphoric acid. Suitable organic acids that can be used include aliphatic carboxylic acid and aromatic acids. Aliphatic acids within this definition may be defined as saturated or unsaturated C_{2-9} carboxylic acids (e.g., aliphatic mono-, di- and tri-carboxylic acids). For example, exemplary monocarboxylic acids within this definition include the saturated C_{2-9} monocarboxylic acids acetic, propionic, butyric, valeric, caproic, enanthic, caprylic pelargonic and capryonic, and the unsaturated C_{2-9} monocarboxylic acids acrylic, propiolic methacrylic, crotonic and isocrotonic acids. Exemplary dicarboxylic acids include the saturated C_{2-9} dicarboxylic acids malonic, succinic, glutaric, adipic and pimelic, while unsaturated C_{2-9} dicarboxylic acids include maleic, fumaric, citraconic and mesaconic acids. Exemplary tricarboxylic acids include the saturated C_{2-9} tricarboxylic acids tricarballylic and 1,2,3-butanetricarboxylic acid. Additionally, the carboxylic acids of this definition may also contain one or two hydroxyl groups to form hydroxy carboxylic acids. Exemplary hydroxy carboxylic acids include glycolic, lactic, glyceric, tartronic, malic, tartaric and citric acid. Aromatic acids within this definition include benzoic and salicylic acid.

Commonly employed water soluble polyvalent metal salts which may be used to help stabilize the encapsulated polypeptides of this invention include, for example: (1) the inorganic acid metal salts of halides (e.g., zinc chloride, calcium chloride), sulfates, nitrates, phosphates and thiocyanates; (2) the aliphatic carboxylic acid metal salts (e.g., calcium acetate, zinc acetate, calcium propionate, zinc glycolate, calcium lactate, zinc lactate and zinc tartrate); and (3) the aromatic carboxylic acid metal salts of benzoates (e.g., zinc benzoate) and salicylates.

E. Methods of treatment:

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of an active agent, will depend on the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the agent is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the agent, and the discretion of the attending physician. The agent is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

A preferred method of treatment is the treatment of IgE-mediated disorders. IgE mediated disorders includes atopic disorders, which are characterized by an inherited propensity to respond immunologically to many common naturally occurring inhaled and ingested antigens and the continual production of IgE antibodies. Specific atopic disorders includes allergic asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis and allergic gastroenteropathy. Atopic patients often have multiple allergies, meaning that they have IgE antibodies to, and symptoms from, many environmental allergens, including pollens, fungi (e.g., molds), animal and insect debris and certain foods.

However disorders associated with elevated IgE levels are not limited to those with an inherited (atopic) etiology. Other disorders associated with elevated IgE levels, that appear to be IgE-mediated and are treatable with the formulations of this present invention include hypersensitivity (e.g., anaphylactic hypersensitivity), eczema, urticaria, allergic bronchopulmonary aspergillosis, parasitic diseases, hyper-IgE syndrome, ataxia-telangiectasia, Wiskott-Aldrich syndrome, thymic aplasia, IgE myeloma and graft-versus-host reaction.

Allergic rhinitis, also known as allergic rhinoconjunctivitis or hay fever, is the most common manifestation of an atopic reaction to inhaled allergens, the severity and duration of which is often correlative with the intensity and length of exposure to the allergen. It is a chronic disease, which may first appear at any age, but the onset is usually during childhood or adolescence. A typical attack consists of profuse watery rhinorrhea, paroxysmal sneezing, nasal obstruction and itching of the nose and palate. Postnasal mucus drainage also causes sore throat, throat clearing and cough. There can also be symptoms of allergic blepharoconjunctivitis, with intense itching of the conjunctivae and eyelids, redness, tearing, and photophobia. Severe attacks are

often accompanied by systemic malaise, weakness, fatigue, and sometime, muscle soreness after intense periods of sneezing.

Asthma, also known as reversible obstructive airway disease, is characterized by hyperresponsiveness of the tracheobronchial tree to respiratory irritants and bronchoconstrictor chemicals, producing attacks of wheezing, dyspnea, chest tightness, and cough that are reversible spontaneously or with treatment. It is a chronic disease involving the entire airway, but varies in severity from occasional mild transient episodes to severe, chronic, life-threatening bronchial obstruction. Asthma and atopy may coexist, but only about half of asthmatics are also atopic, and an even smaller percentage of atopic patients also have asthma. However, atopy and asthma are not entirely independent in that asthma occurs more frequently among atopic than amongst nonatopic individuals, especially during childhood. Asthma has further been historically broken down into two subgroups, extrinsic asthma and intrinsic asthma.

Extrinsic asthma, also known as allergic, atopic or immunologic asthma, is descriptive of patients that generally develop asthma early in life, usually during infancy or childhood. Other manifestations of atopy, including eczema or allergic rhinitis often coexist. Asthmatic attacks can occur during pollen seasons, in the presence of animals, or on exposure to house dust, feather pillows, or other allergens. Skin tests show positive wheal-and-flare reactions to the causative allergens. Interestingly, total serum IgE concentrations is frequently elevated, but is sometimes normal.

Intrinsic asthma, also known as nonallergic or idopathic asthma, typically first occurs during adult life, after and apparent respiratory infection. Symptoms include chronic or recurrent bronchial obstruction unrelated to pollen seasons or exposure to other allergens. Skin tests are negative to the usual atopic allergens, serum IgE concentration is normal. Additional symptoms include sputum blood and eosinophilia. Other schemes for classifying asthma into subgroups, like aspirin-sensitive, exercise-induced, infectious and psychologic merely define external triggering factors that affect certain patients more so than others.

Finally, it is important to note that while some classifications have historically associated only allergic asthma with IgE dependency, there is now strong statistically

70
64
significant data showing a correlation between IgE and asthma (both allergic and non-allergic). Chapter 27, "The Atopic Diseases", A.I. Terr in Medical Immunology, 9th Ed., Simon and Schuster, Stites et al, Ed. (1997). As a result, the term "IgE-mediated disorders", for purposes of this patent application, includes both allergic and non-allergic asthma.

Physical signs of an asthma attack include tachypnea, audible wheezing, and use of the accessory muscles of respiration. Rapid pulse and elevated blood pressure are also typically present, as are elevated levels of eosinophils in the peripheral blood and nasal secretions. Pulmonary functions show a decrease in flow rates and 1 second forced expiratory volume (FEV₁). The total lung capacity and functional residual capacity are typically normal or slightly increased, but may be decreased with extreme bronchospasm.

The pathology of asthma can be distinguished by early phase and late phase reactions. The early phase is characterized by smooth muscle contraction, edema and hypersecretion, while the late phase reactions by cellular inflammation. Asthma can be induced by various non-specific triggers including infections (e.g., viral respiratory infections), physiologic factors (e.g., exercise, hyperventilation, deep breathing, psychologic factors), atmospheric factors (e.g., sulfur dioxide, ammonia, cold air, ozone, distilled water vapor), ingestants (e.g., propranolol, aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs), experimental inhalants (e.g., hypertonic solutions, citric acid, histamine, methacholine, prostaglandin F_{2α}) and occupational inhalants (e.g., isocyanates). Various additional occupational or environmental allergens that cause allergic asthma can include, animal products, insect dusts, sea creatures, plant products, fruits, seeds, leaves and pollens, organic dyes and inks, microbial agents, enzymes, therapeutic agents, sterilizing agents, inorganic and organic chemicals.

Atopic dermatitis, also known as eczema, neurodermatitis, atopic eczema or Besnier's prurigo, is common chronic skin disorder specific to a subset of patients with the familial and immunologic features of atopy. The essential feature is a pruritic dermal inflammatory response, which induces a characteristic symmetrically distributed skin eruption with predilection for certain sites. There is also frequent overproduction of IgE by B lymphocytes. While atopic dermatitis is classified as a cutaneous form of atopy because it is associated with allergic rhinitis and asthma and

high IgE levels, the severity of the dermatitis, however, does not always correlate with exposure to allergens on skin testing, and desensitization (unlike other allergic diseases) is not effective treatment. While high serum IgE is confirmatory of a diagnosis of allergic asthma, normal levels do not preclude it. Onset of the disease can occur at any age, and lesions begin acutely with erythematous edematous papule or plaque with scaling. Itching leads to weeping and crusting, then to chronic lichenification. On the cellular level, acute lesion is edemous and the dermis is infiltrated with mononuclear cells, CD4 lymphocytes. Neutrophils, eosinophils, plasma cells and basophils are rare, but degranulated mast cells are present. Chronic lesions feature epidermal hyperplasia, hyperkeratosis and parakeratosis, and the dermis is infiltrated with mononuclear cells, Langerhans' cells and mast cells. There may also be focal areas of fibrosis, including involvement of the perineurium of small nerves.

Allergic gastroenteropathy, also known as eosinophilic gastroenteropathy, is an unusual atopic manifestation in which multiple IgE food sensitivities are associated with a local gastrointestinal tract mucosal reaction. It is rare in adults, but more common, but transient, in infants. The condition results when ingested food allergens react with local IgE antibodies in the jejunal mucosa liberate mast cell mediators, resulting in gastrointestinal symptoms shortly after the meal. Continued exposure produced chronic inflammation, resulting in gastrointestinal proteins loss and hypoproteinemic edema. Blood loss through the inflamed intestinal mucosa may be significant enough to cause iron deficiency anemia. The allergic reaction occurs locally in the upper gastrointestinal mucosa following allergen exposure, but resolves with allergen avoidance.

Anaphylaxis and *urticaria* are clearly IgE-mediated, but they lack genetic determinants, and have no predilection for atopic individuals. Anaphylaxis is an acute, generalized allergic reaction with simultaneous involvement of several organ systems, usually cardiovascular, respiratory, cutaneous and gastrointestinal. The reaction is immunologically mediated, and it occurs on exposure to an allergen to which the subject has been previously sensitized. Urticaria and angioedema refers to the physical swelling, erythema and itching resulting from histamine stimulated receptor in superficial cutaneous blood vessels, and is the hallmark cutaneous feature

72
✓

of systemic anaphylaxis. Systemic anaphylaxis is the occurrence of an IgE-mediated reaction simultaneously in multiple organs resulting from drug, insect venom or food. It is caused suddenly by allergen induced, mast cell loaded IgE, resulting in profound and life-threatening alteration in the functioning of various vital organs. Vascular collapse, acute airway obstruction, cutaneous vasodilation and edema, and gastrointestinal and genitourinary muscle spasm occur almost simultaneously, although not always to the same degree.

The pathology of anaphylaxis includes angioedema and hyperinflated lungs, with mucous plugging of airways and focal atelectasis. On a cellular level, the lungs appear similarly as during an acute asthma attack, with hypersecretion of bronchial submucosal glands, mucosal and submucosal edema, peribronchial vascular congestion and eosinophilia in the bronchial walls. Pulmonary edema and hemorrhage may be present. Bronchial muscle spasm, hyperinflation, and even rupture of alveoli may also be present. Important feature of human anaphylaxis include edema, vascular congestion, and eosinophilia in the lamina propria of the larynx, trachea, epiglottis and hypopharynx.

Exposure to the allergen may be through ingestion, injection, inhalation or contact with skin or mucous membrane. The reaction begins within seconds or minutes after exposure to the allergen. There may be an initial fright or sense of impending doom, followed rapidly by symptoms in one or more target organ systems: cardiovascular, respiratory, cutaneous and gastrointestinal.

The allergens responsible for anaphylaxis differ from those commonly associated with atopy. Foods, drugs, insect venoms or latex are the common sources. Food allergens includes those found in crustaceans, mollusks (e.g., lobster, shrimp, crab), fish, legumes (e.g., peanuts, peas, beans, licorice), seeds (e.g. sesame, cottonseed, caraway, mustard, flaxseed, sunflower), nuts, berries, egg whites, buckwheat and milk. Drug allergens include those found in heterologous proteins and polypeptides, polysaccharides and haptenic drugs. Insect allergens include Hymenoptera insects, including the honeybee, yellow jacket, hornet, wasp and fire ant.

73 73

While epinephrine is the typical treatment for anaphylaxis, antihistamine or other histamine blockers are typically prescribed for less severe urticaria or angioedemic reaction.

5 F. Combination Therapies

The method of the invention can be combined with known methods of treatment for IgE-mediated disorder, either as combined or additional treatments steps or as additional components of a therapeutic formulation.

For example, antihistamines, especially non-sedating antihistamines may be
10 administered before, prior to, or commensurate with the anti-IgE antibodies of the invention. Suitable antihistamines include those of the alkylamine (*e.g.*, chlorpheniramine), ethanolamine (*e.g.*, diphenhydramine) and phenothiazine (*e.g.*, promethazine). While many antihistamines antagonize the pharmacological effects of histamine by blocking its receptor sites on the effector cells, other common
15 antihistamine drugs operate by blocking histamine release from mast cells that have been sensitized and armed with allergen-specific IgE (*e.g.*, cromolyn sodium). Example antihistamines include astemizole, azatadine maleate, bropheniramine maleate, carbinoxamine maleate, cetirizine hydrochloride, clemastine fumarate, cyproheptadine hydrochloride, dexbrompheniramine maleate, dexchlorpheniramine
20 maleate, dimenhhydrinate, diphenhydramine hydrochloride, doxylamine succinate, fexofendadine hydrochloride, terphenadine hydrochloride, hydroxyzine hydrochloride, loratidine, meclizine hydrochloride, tripelannamine citrate, tripelennamine hydrochloride, triprolidine hydrochloride.

Particular symptoms of IgE-mediated disorders (*e.g.*, early phase reactions)
25 can be ameliorated with sympathomimetics or drugs having bronchodilator effect. Epinephrine is a broad acting alpha and beta-adrenergic often administered subcutaneously in a dose of 0.2 - 0.5 mL of 1:100 aqueous solution. A longer acting form of epinephrine (*i.e.*, terbutaline) in 1:200 suspension is also used when a longer duration effect is desired. Suitable additional beta-adrenergics include albuterol,
30 pirbuterol, metaproterenol, salmeterol, isoetharine and formoterol for administration nasally (*e.g.*, hand-held nebulizer, intermittent positive-pressure breathing device, or metered-dose pressurized inhalers) or orally.

Bronchodilation can also be achieved through administration of xanthines, especially when they are administered in combination with the above sympathomimetic drugs. Example xanthines include aminophylline (iv. 250-500 mg) and theophylline (oral, 10-20 µg/ml serum concentration).

- 5 Other symptoms from various IgE-mediated disorders (*e.g.*, late phase reactions) can be attenuated by treatment with glucocorticoids or other drugs having anti-inflammatory effects. Prednisone (30-60 mg daily) is administered systemically for severe attacks, while beclomethasone dipropionate, triamcinolone acetonide and flunisolide are administered in aerosolized form as long-term maintenance therapy.
- 10 Additionally corticosteroids that have anti-inflammatory effects include: betamethasone, budesonide, dexamethasone, fludrocortisone acetate, flunisolide, fluticasone propionate, hydrocortisone, methylprednisolone, prednisolone, prednisone, triamcinolone.

- Non-steroidal anti-inflammatory drugs that may also be used in combination
- 15 with the therapeutic methods of the invention include, acetaminophen, aspirin, bromfenac sodium, diclofenac sodium, diflunisal, etodolac, fenoprofen calcium, flurbiprofen, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, meclofenamate sodium, mefenamic acid, nabumetone, naproxen, naproxen sodium, oxyphenbutazone, phenylbutzone, piroxicam, sulindac, tolmetin sodium.

- 20 Additionally, the maximum therapeutic benefit may also be achieved with the administration of decongestants (*e.g.*, phenylephrine, phenylpropanolamine, pseudoephedrine), cough suppressants (*e.g.*, dextromethorphan, codeine, or hydrocodone) or analgesic (*e.g.*, acetaminophen, aspirin).

- Allergen desensitization is a treatment form in which allergens are injected
- 25 into the patient for the purpose of reducing or eliminating the allergic response. It is also known as allergen immunotherapy, hyposensitization or allergy injection therapy. It is often used in combination with other allergy treatments, but not often as a primary treatment. It has been successfully employed when allergen avoidance is impossible. A typical allergen desensitization treatment incorporates subcutaneous
- 30 injection of sterile allergen in increasing doses once or twice a week until a dose is achieved that produces a transient small local area of inflammation at the injection site. The dose is then given on a maintenance schedule once every 2-4 weeks.

75

Allergic desensitization is most often used in the treatment of allergic asthma and allergic rhinitis, although it has had success in treating anaphylaxis. Desensitization has also been effectively used through the use of adjuvants, such as incomplete Freund's adjuvant, which is an emulsion of aqueous antigen in mineral oil. The physiological effect creates an insoluble liquid depot from which droplets of allergen are gradually released. Another form of allergen desensitization is to polymerize monomeric allergens with glutaraldehyde to create a molecule with relatively low allergenicity (i.e., causes allergic response), while retaining an effective degree of immunogenicity.

G. Pharmaceutical Dosages:

Dosages and desired drug concentration of pharmaceutical compositions of the present invention may vary depending on the particular use envisioned. The determination of the appropriate dosage or route of administration is well within the skill of an ordinary artisan. Animal experiments provide reliable guidance for the determination of effective doses for human therapy. Interspecies scaling of effective doses can be performed following the principles laid down by Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp.42-46.

When *in vivo* administration of the polypeptides or antibodies described herein are used, normal dosage amounts may vary from about 10 ng/kg up to about 100 mg/kg of mammal body weight or more per day, preferably about 1 mg/kg/day to 10 mg/kg/day, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature; see, for example, U.S. Pat. Nos. 4,657,760; 5,206,344; or 5,225,212. It is within the scope of the invention that different formulations will be effective for different treatments and different disorders, and that administration intended to treat a specific organ or tissue may necessitate delivery in a manner different from that to another organ or tissue. Moreover, dosages may be administered by one or more separate administrations, or by continuous infusion. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of

76 76

disease symptoms occurs. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays.

H. Administration of the Formulation

5 The formulations of the present invention, including but not limited to reconstituted formulations, are administered to a mammal in need of treatment with the protein, preferably a human, in accord with known methods, such as intravenous administration as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular,
10 intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes.

In preferred embodiments, the formulations are administered to the mammal by subcutaneous (*i.e.* beneath the skin) administration. For such purposes, the formulation may be injected using a syringe. However, other devices for administration of the formulation are available such as injection devices (*e.g.* the
15 Inject-easeTM and GenjectTM devices); injector pens (such as the GenPenTM); auto-injector devices, needleless devices (*e.g.* MediJectorTM and BioJectorTM); and subcutaneous patch delivery systems.

In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for a single dose-administration unit. Such kits comprise a container of an aqueous formulation
20 of therapeutic protein or antibody, including both single or multi-chambered pre-filled syringes. Exemplary pre-filled syringes are available from Vetter GmbH, Ravensburg, Germany.

The appropriate dosage ("therapeutically effective amount") of the protein will depend, for example, on the condition to be treated, the severity and course of the
25 condition, whether the protein is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the protein, the type of protein used, and the discretion of the attending physician. The protein is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments and may be administered to the patient at any time from diagnosis onwards. The protein may be
30 administered as the sole treatment or in conjunction with other drugs or therapies useful in treating the condition in question.

77
77

Where the protein of choice is an antibody, from about 0.1-20 mg/kg is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques.

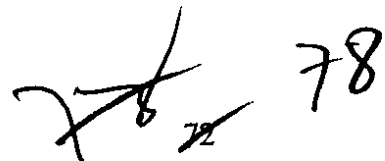
- 5 Uses for an anti-IgE formulation (*e.g.*, rhuMAbE-25, rhMAbE-26, Hu-901) include the treatment or prophylaxis of IgE-mediated allergic diseases, parasitic infections, interstitial cystitis and asthma, for example. Depending on the disease or disorder to be treated, a therapeutically effective amount (*e.g.* from about 1-15 mg/kg) of the anti-IgE antibody is administered to the patient.

10

I. Articles of Manufacture

- In another embodiment of the invention, an article of manufacture is provided which contains the formulation and preferably provides instructions for its use. The article of manufacture comprises a container. Suitable containers include, for
15 example, bottles, vials (*e.g.* dual chamber vials), syringes (such as single or dual chamber syringes) and test tubes. The container may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds the formulation and the label on, or associated with, the container may indicate directions for reconstitution and/or use. The label may further indicate that the formulation is useful or intended for
20 subcutaneous administration. The container holding the formulation may be a multi-use vial, which allows for repeat administrations (*e.g.* from 2-6 administrations) of the reconstituted formulation. The article of manufacture may further comprise a second container comprising a suitable diluent (*e.g.* BWFI). Upon mixing of the diluent and the lyophilized formulation, the final protein concentration in the
25 reconstituted formulation will generally be at least 50 mg/ml. The article of manufacture may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

- The invention will be more fully understood by reference to the following
30 examples. They should not, however, be construed as limiting the scope of the invention. All citations throughout the disclosure are hereby expressly incorporated by reference.



In another embodiment, the invention provides for an article of manufacture comprising the formulations described herein for administration in an auto-injector device. An auto-injector can be described as an injection device that upon activation, will deliver its contents without additional necessary action from the patient or administrator. They are particularly suited for self-medication of therapeutic formulations when delivery rate must be constant and the time of delivery is greater than a few moments.

EXAMPLE 1

10 Preparation of Anti-IgE rhuMAbE25 ("E25") Formulation

Formulations of the monoclonal anti-IgE antibody rhuMAbE25 were prepared from E25 bulk residual Lot K9094A (40 mg/ml rhuMAb E25, 85 mM trehalose, 5 mM histidine, pH 6, 0.01% Tween 20) or rhuMAbE25 Q-Pool (5 mg/ml rhuMAb E25, 25 mM Tris, 200 mM NaCl).

15 Aqueous solutions of rhuMAbE25 was prepared by dialysis into different buffers (20 mM His-HCl and 200 mM Arg-HCl, pH 6.0) at 2-8°C using a Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Pierce). The samples were then transferred into the sample reservoir of a Centricon-30 centrifugal microconcentrators (Amicon). The proteins were
20 concentrated by spinning the Centricon-3 concentrator at 4000-5000 g until the desired protein concentration is achieved.

The samples were then concentrated to ~150 mg/ml of rhuMAb E25 using ultrafiltration. Tween 20 was added to each preparation to a final concentration of
25 0.02%. All formulations were filtered, aseptically filled into 3 cc FormaVitrum vials and stoppered with 13-mM Diakyo stoppers in a Class 100 room.

EXAMPLE 2

Method and Materials:

5 **Stability Studies:** All formulations were filled at 1 ml in 3 cc FormaVitrum glass vials and stoppered with 13-mm Diakyo stoppers in a Class 100 sterile filling suite. Vials were placed at -70, 2-8, 15, 30 and 40°C in light impermeable containers.

10 **Agitation Study:** Aliquots of each formulation were placed in the glass vials. Vials were agitated horizontally on a Glas-Col Bench Top Shaker at room temperature. The shaker was set at 70 with an arm length of 30 cm (maximum). After agitation, samples were inspected and analyzed according to the following protocol.

15 **Freeze-Thawing Study:** Samples of E25 underwent three cycles of freeze-thaw. Each cycle consisted of freezing at -70°C overnight and subsequently thawing at room temperature for about one hour. After each cycle, samples were inspected visually using a light box to assess the color and clarity of the liquid. Turbidity and soluble aggregates were measured following the protocol described below.

20 **Analytical Methods:** Stability samples were analyzed by the methods outlined in Table 1

Table 1: Analytical Methods

Assay	Purpose
Color, Clarity, Appearance ^a	Visual inspection of liquid formulations
Size Exclusion Chromatography (SEC) ^b	Measures % monomer, soluble aggregates and low molecular weight components
Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) ^c	Measures level of Asp-32 isomerization and free thiol
UV Spec Scan (Gravimetric) ^f	Measures protein concentration
Turbidity (Mean OD 340-360 nm) ^d	Measures soluble and insoluble aggregates
Activity ^e	Determines binding activity of anti-IgE

^a Pass for Color, Appearance and Clarity:

The color, appearance and clarity of the sample were visually assessed against the white and black background of the inspection and compared to an equal volume of negative control. Samples should be carefully swirled to ensure homogenous mixing, but not so vigorously so as to create air bubbles.

5

^b Size Exclusion Chromatography:

A TSK SUPER SW3000 (4.6 x 300 mm) column was used in an HP 1100 chromatography system. The column was loaded with 20 µg protein and eluted in 0.1 M potassium phosphate, pH 6.8. The sample was measured at 280 nm by a UV
10 detector.

^c Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC):

The HIC experiments were conducted using a TSK Phenyl-5PW (7.5 x 75 mm) column (TosoHaas) on an HP 1100 liquid chromatography system. The column was
15 loaded with 28 µg of papain digested Fab fragments and eluted with a concentration gradient of ammonium sulfate in 20 mM Tris buffer from 2 M to 0 M. The peaks were monitored at 210 nm by a UV detector.

^d Turbidity:

20 The turbidity of samples were determined in a 1-cm path length cuvette using a HP spectrometer. The turbidity was calculated as the average absorbance from 340-360 nm.

^e The activity of of the anti-IgE monoclonal antibody was determined by a receptor
25 binding inhibition assay. Samples were diluted to fall within the range of the standard curve from 100 and 1.56 µg/ml in an assay diluent containing phosphste buffer, 0.5% BSA, 0.05% polysorbate 20, 0.01% Thimerosol. A microtiter plate was coated with IgE receptor, then incubated with the IgE-biotin and diluted anti-IgE sample. The amount of IgE-Biotin bound to the receptor that correlated with activity of anti-IgE
30 monoclonal antibody was measured using Streptavidin-HRP. The data were analyzed using a 4-parameter logistic curve-fitting program.

^f The concentration of antibody was obtained on a Hewlett Packard 8453 diode array spectrophotometer with a 1-cm quartz cuvette. The concentration was calculated using an absorptivity of $1.5 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/ml})^{-1}$

82

Summary of Liquid Formulations

Formulations	Protein Ranges	Buffer/Ranges	Excipients/Ranges
80 mg/ml E25 50 mM Histidine-HCl 150 mM Trehalose 0.05% Polysorbate 20 pH 6.0	40-150 mg/ml	His-HCl or His-Acetate Ranges: 10 mM – 100 mM	Trehalose or Sucrose Sugar Ranges: 20 mM –350 mM Polysorbate: 0.01%-0.1%
150 mg/ml E25 20 mM Histidine-HCl 200 mM ArgHCl 0.02% Polisorbate 20 pH 6.0	40-260 mg/ml	His-HCl or His-Acetate Ranges: 10 mM – 100 mM	ArgHCl Ranges: 50 mM –200 mM Polysorbate: 0.01%-0.1%

Stability Data for 150 mg/ml E25 in Histidine and ArgHCl formulation

Temp (°C)	Time (months)	Visual	pH	SEC ^a % Monomer	HIC ^b % of Main	Potency ^c	Turbidity ^d
5	0	pass	6.2	99.0	64	106	0.25
	1	pass	6.0	99.2	63	100	0.27
	3	pass	6.0	99.3	63	111	0.25
	16	pass	6.0	98.9	62	83	0.27
30	1	pass	5.9	98.43	54	91	0.25
	3	Pass	6.1	97.53	42	65	0.30
	16	Pass	6.0	90.63	19	28	0.54

5

Stability Data for 80 mg/ml E25 in Histidine and Trehalose formulation

Temp (°C)	Time (Months)	Visual	pH	SEC ^a % Monomer	HIC ^b % Main	Potency ^c	Turbidity ^d
5	0	Pass	5.7	99.1	64	100	0.20
	1	Pass	5.8	98.7	63	92	0.20
	3	Pass	5.7	98.8	63	124	0.20
	6	Pass	5.7	99.1	63	97	0.21
	14	Pass	5.7	99.0	62	83	0.21
	24	Pass	5.7	98.8	62	84	0.20
30	1	Pass	5.8	98.7	55	77	0.20
	3	Pass	5.7	97.4	41	76	0.29
	6	Pass	5.8	95.5	31	48	0.38
	14	Pass	5.7	93.1	22	30	0.48

- a. Size exclusion chromatography for measuring soluble aggregates and fragments
- b. Hydrophobic interaction chromatography for papain digested E25.
- c. IgE receptor binding inhibition assay

83

d. Mean OD (340-360 nm)

Agitation study:

	TO			Shaking after 3 days		
Formulation	Visual	SEC (% Monomer)	Turbidity	Visual	SEC (% Monomer)	Turbidity
1	Pass	99.5	0.18	pass	99.3	0.18
2	Pass	99.0	0.19	pass	99.4	0.19

Formulation 1: 156 mg/ml E25, 200 mM ArgCl, 23 mM His, 0.02 % T20

Formulation 2: 150 mg/ml E25, 182 mM ArgCl, 20 mM His, 0.02 % T20

Freeze thawing study:

	TO			After 1 st Cycle			After 3 rd Cycle		
Formulation	Visual	SEC % Monomer	Turbidity	Visual	SEC % Monomer	Turbidity	Visual	SEC % Monomer	Turbidity
1	pass	99.5	0.18	pass	99.3	0.17	pass	99.4	0.17
2	pass	99.0	0.19	pass	99.2	0.19	pass	99.2	0.18

Formulation 1: 156 mg/ml E25, 200 mM ArgCl, 23 mM His, 0.02 % T20

Formulation 2: 150 mg/ml E25, 182 mM ArgCl, 20 mM His, 0.02 % T20

EXAMPLE 3

Samples of the anti-IgE monoclonal antibody (E26) liquid formulations were prepared in 20 mM buffers and then stored at 30°C and 40 °C. The stability of E26 was determined by chromatography and activity measurements. The size exclusion chromatography was used for determining the soluble aggregates, and the hydrophobic interaction chromatography of pepsin digested sample was used for measuring isomerization. The activity of sample was monitored by using an IgE receptor binding inhibition assay. As shown in figure 1, 2 and 3, the degradation of E26 is highly dependent on pH of buffers. The E26 appears to be most stable around pH 6.0.

EXAMPLE 4

84
78

The particulate formulation is a major challenge for making the high concentration liquid formulation, since it usually increases with increasing of protein concentration under the stressed conditions. Figure 4 shows the result of agitation study for a concentrated E26 liquid formulation. The formulation was prepared in 20 mM succinate, 192 mM trehalose at pH 6.0 with different concentration of polysorbate 20. The particulate formulation was monitored by turbidity measurement. The result shows that the turbidity of E26 solution increases with agitation time. The addition of at least 0.01% of polysorbate is essential for reducing the particulate formation under the stressed condition. Similar results were also observed for concentrated E25 liquid formulation.

EXAMPLE 5

Figure 5 shows the liquid formulation of 150 mg/ml E25 prepared by reconstitution of the lyophilized E25. Increasing of salt concentration inhibits the reversible particulate formation and results in the reduction of turbidity reading. Among all the salts tested, the formulation with Arg-HCl appears to have the least turbidity. The effect of salt concentration on lowering the turbidity reading has also been observed for E25 prepared using a TFF process.

EXAMPLE 6

The liquid formulation of E25 in the presence of ArgHCl also appears to have better stability than other liquid formulations. Figure 6 and 7 show the stability study of E25 at 150 mg/ml in liquid formulations containing ArgHCl, CaCl_2 and MgCl_2 . For liquid formulation containing ArgHCl with or without sucrose, there is little difference in heir stability in terms of turbidity, isomerization and fragmentation. The liquid formulations containing ArgHCl are more stable than the formulation containing MgCl_2 and CaCl_2 .

EXAMPLE 7

Figure 8 shows the results of a stability study of E25 liquid formulation with acetate and histidine formulations. The formulation with histidine has higher pH than the acetate formulation. The results clearly showed that the E25 in a histidine, ArgHCl liquid formulation are more stable than under other conditions.

5

EXAMPLE 8

The high concentration of E25 can form solid gel in the presence of certain ions, such as citrate, succinate and sulfate (table I), particularly at storage temperature of 2-8 °C. Using arginine-HCl as an excipient allows us to formulate E25 up to more than 200 mg/ml without gel or precipitate formation.

10

86

Table 1: Effect of various excipients on gelation of E25 at 125 mg/ml, pH ~6.0

<i>Excipient</i>	<i>Excipient Concentration MM</i>	<i>Preparation</i>	<i>Turbidity at T0 (340-360 nm)</i>	<i>Antibody Concentration mg/ml</i>	<i>Visual Appearance</i>
SWFI		Lyo Recon	0.21	125	Clear
NaCl	188	Lyo Recon	0.25	125	Clear
Succinate	94	Lyo Recon	0.31	125	Gel
Succinate	19	Lyo Recon	0.28	125	Gel
Citrate	188	Lyo Recon	Pending	125	Gel
Citrate	19	Lyo Recon	Pending	125	Gel
Na ₂ SO ₄	Pending	Lyo Recon	Pending	125	Gel
Na ₂ SO ₄	Pending	Lyo Recon	Pending	125	Opalescent
Phosphate	Pending	Lyo Recon	Pending	125	Opalescent
Acetate	188	Lyo Recon	Pending	125	Clear
Acetate	94	Lyo Recon	Pending	125	Clear
Acetate	19	Lyo Recon	Pending	125	Clear
Histidine	94	Lyo Recon	0.19	125	Clear
Histidine	47	Lyo Recon	0.24	125	Clear
Arginine- HCl	150	Lyo Recon	0.25	137	Clear
Arginine- HCl	200	TFF	0.19	162	Clear
Arginine- SO ₄	150	Lyo Recon	0.27	137	Gel
CaCl ₂	125	TFF	0.32	147	Clear
MgCl ₂	125	TFF	0.48	147	Opalescent

EXAMPLE 9

Expression of protein or antibody in *E. coli*

This example illustrates preparation of an unglycosylated form of a desired
5 protein or antibody by recombinant expression in *E. coli*.

The DNA sequence encoding the desired protein or antibody is initially
amplified using selected PCR primers. The primers should contain restriction
enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected
expression vector. A variety of expression vectors may be employed. An example of
10 a suitable vector is pBR322 (derived from *E. coli*; see Bolivar *et al.*, *Gene*, 2:95
(1977)) which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance. The vector is
digested with restriction enzyme and dephosphorylated. The PCR amplified
sequences are then ligated into the vector. The vector will preferably include
sequences which encode for an antibiotic resistance gene, a trp promoter, a polyhis
15 leader (including the first six STII codons, polyhis sequence, and enterokinase
cleavage site), the coding region of the desired protein or antibody, lambda
transcriptional terminator, and an argU gene. Additionally, the vector may include at
least not insignificant portions of the untranslated 5' and 3' sections of the native
sequence nucleic acid encoding the desired protein or antibody.

20 The ligation mixture is then used to transform a selected *E. coli* strain using
the methods described in Sambrook *et al.*, *supra*. Transformants are identified by
their ability to grow on LB plates and antibiotic resistant colonies are then selected.
Plasmid DNA can be isolated and confirmed by restriction analysis and DNA
sequencing.

25 Selected clones can be grown overnight in liquid culture medium such
as LB broth supplemented with antibiotics. The overnight culture may subsequently
be used to inoculate a larger scale culture. The cells are then grown to a desired
optical density, during which the expression promoter is turned on.

After culturing the cells for several more hours, the cells can be harvested by
30 centrifugation. The cell pellet obtained by the centrifugation can be solubilized using
various agents known in the art, and the solubilized desired protein or antibody can

48
82

then be purified using a metal chelating column under conditions that allow tight binding of the solubilized protein or antibody.

The desired protein or antibody may be expressed in *E. coli* in a poly-His tagged form, using the following procedure. The DNA encoding the desired protein or antibody is initially amplified using selected PCR primers. The primers will contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector, and other useful sequences providing for efficient and reliable translation initiation, rapid purification on a metal chelation column, and proteolytic removal with enterokinase. The PCR-amplified, poly-His tagged sequences are then ligated into an expression vector, which is used to transform an *E. coli* host based on strain 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq). Transformants are first grown in LB containing 50 mg/ml carbenicillin at 30EC with shaking until an O.D.600 of 3-5 is reached. Cultures are then diluted 50-100 fold into CRAP media (prepared by mixing 3.57 g (NH₄)₂SO₄, 0.71 g sodium citrate·2H₂O, 1.07 g KCl, 5.36 g Difco yeast extract, 5.36 g Sheffield hycase SF in 500 mL water, as well as 110 mM MPOS, pH 7.3, 0.55% (w/v) glucose and 7 mM MgSO₄) and grown for approximately 20-30 hours at 30EC with shaking. Samples are removed to verify expression by SDS-PAGE analysis, and the bulk culture is centrifuged to pellet the cells. Cell pellets are frozen until purification and refolding.

E. coli paste from 0.5 to 1 L fermentations (6-10 g pellets) is resuspended in 10 volumes (w/v) in 7 M guanidine, 20 mM Tris, pH 8 buffer. Solid sodium sulfite and sodium tetrathionate is added to make final concentrations of 0.1M and 0.02 M, respectively, and the solution is stirred overnight at 4EC. This step results in a denatured protein with all cysteine residues blocked by sulfitolization. The solution is centrifuged at 40,000 rpm in a Beckman Ultracentrifuge for 30 min. The supernatant is diluted with 3-5 volumes of metal chelate column buffer (6 M guanidine, 20 mM Tris, pH 7.4) and filtered through 0.22 micron filters to clarify. The clarified extract is loaded onto a 5 ml Qiagen Ni-NTA metal chelate column equilibrated in the metal chelate column buffer. The column is washed with additional buffer containing 50 mM imidazole (Calbiochem, Utrol grade), pH 7.4. The protein is eluted with buffer containing 250 mM imidazole. Fractions containing the desired protein are pooled

89
83

and stored at 4EC. Protein concentration is estimated by its absorbance at 280 nm using the calculated extinction coefficient based on its amino acid sequence.

The proteins are refolded by diluting the sample slowly into freshly prepared refolding buffer consisting of: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M urea, 5 mM
5 cysteine, 20 mM glycine and 1 mM EDTA. Refolding volumes are chosen so that the final protein concentration is between 50 to 100 micrograms/ml. The refolding solution is stirred gently at 4EC for 12-36 hours. The refolding reaction is quenched by the addition of TFA to a final concentration of 0.4% (pH of approximately 3). Before further purification of the protein, the solution is filtered through a 0.22
10 micron filter and acetonitrile is added to 2-10% final concentration. The refolded protein is chromatographed on a Poros R1/H reversed phase column using a mobile buffer of 0.1% TFA with elution with a gradient of acetonitrile from 10 to 80%. Aliquots of fractions with A280 absorbance are analyzed on SDS polyacrylamide gels and fractions containing homogeneous refolded protein are pooled. Generally, the
15 properly refolded species of most proteins are eluted at the lowest concentrations of acetonitrile since those species are the most compact with their hydrophobic interiors shielded from interaction with the reversed phase resin. Aggregated species are usually eluted at higher acetonitrile concentrations. In addition to resolving misfolded forms of proteins from the desired form, the reversed phase step also
20 removes endotoxin from the samples.

Fractions containing the folded desired protein or antibody are pooled and the acetonitrile removed using a gentle stream of nitrogen directed at the solution. Proteins are formulated into 20 mM Hepes, pH 6.8 with 0.14 M sodium chloride and 4% mannitol by dialysis or by gel filtration using G25 Superfine (Pharmacia) resins
25 equilibrated in the formulation buffer and sterile filtered.

EXAMPLE 10

Expression of protein or antibody in mammalian cells

This example illustrates preparation of a potentially glycosylated forms of the
30 desired protein or antibody by recombinant expression in mammalian cells.

The vector, pRK5 (see EP 307,247, published March 15, 1989), is employed as the expression vector. Optionally, DNA encoding the desired protein or antibody

is ligated into pRK5 with selected restriction enzymes to allow insertion such DNA using ligation methods such as described in Sambrook *et al.*, *supra*.

In one embodiment, the selected host cells may be 293 cells. Human 293 cells (ATCC CCL 1573) are grown to confluence in tissue culture plates in medium such as DMEM supplemented with fetal calf serum and optionally, nutrient components and/or antibiotics. About 10 μ g of DNA encoding the desired protein or antibody ligated into pRK5 is mixed with about 1 μ g DNA encoding the VA RNA gene [Thimmappaya *et al.*, *Cell*, 31:543 (1982)] and dissolved in 500 μ l of 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl_2 . To this mixture is added, dropwise, 500 μ l of 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO_4 , and a precipitate is allowed to form for 10 minutes at 25°C. The precipitate is suspended and added to the 293 cells and allowed to settle for about four hours at 37°C. The culture medium is aspirated off and 2 ml of 20% glycerol in PBS is added for 30 seconds. The 293 cells are then washed with serum free medium, fresh medium is added and the cells are incubated for about 5 days.

Approximately 24 hours after the transfections, the culture medium is removed and replaced with culture medium (alone) or culture medium containing 200 μ Ci/ml ^{35}S -cysteine and 200 μ Ci/ml ^{35}S -methionine. After a 12 hour incubation, the conditioned medium is collected, concentrated on a spin filter, and loaded onto a 15% SDS gel. The processed gel may be dried and exposed to film for a selected period of time to reveal the presence of the desired protein or antibody. The cultures containing transfected cells may undergo further incubation (in serum free medium) and the medium is tested in selected bioassays.

In an alternative technique, the desired protein or antibody may be introduced into 293 cells transiently using the dextran sulfate method described by Sompayrac *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). 293 cells are grown to maximal density in a spinner flask and 700 μ g DNA encoding the desired protein or antibody ligated into pRK5 is added. The cells are first concentrated from the spinner flask by centrifugation and washed with PBS. The DNA-dextran precipitate is incubated on the cell pellet for four hours. The cells are treated with 20% glycerol for 90 seconds, washed with tissue culture medium, and re-introduced into the spinner flask containing tissue culture medium, 5 μ g/ml bovine insulin and 0.1 μ g/ml bovine

transferrin. After about four days, the conditioned media is centrifuged and filtered to remove cells and debris. The sample containing the expressed desired protein or antibody can then be concentrated and purified by any selected method, such as dialysis and/or column chromatography.

5 In another embodiment, the desired protein or antibody can be expressed in CHO cells. The DNA encoding the desired protein or antibody ligated into pRK5 can be transfected into CHO cells using known reagents such as CaPO_4 or DEAE-dextran. As described above, the cell cultures can be incubated, and the medium replaced with culture medium (alone) or medium containing a radiolabel such as ^{35}S -methionine.
10 After determining the presence of the desired protein or antibody, the culture medium may be replaced with serum free medium. Preferably, the cultures are incubated for about 6 days, and then the conditioned medium is harvested. The medium containing the expressed desired protein or antibody can then be concentrated and purified by any selected method.

15 Epitope-tagged variants of the desired protein or antibody may also be expressed in host CHO cells. The DNA encoding the desired protein or antibody ligated into pRK5 may be subcloned out of the pRK5 vector. The subclone insert can undergo PCR to fuse in frame with a selected epitope tag such as a poly-his tag into a Baculovirus expression vector. The poly-his tagged DNA encoding the desired
20 protein or antibody insert can then be subcloned into a SV40 driven vector containing a selection marker such as DHFR for selection of stable clones. Finally, the CHO cells can be transfected (as described above) with the SV40 driven vector. Labeling may be performed, as described above, to verify expression. The culture medium containing the expressed poly-His tagged desired protein or antibody can then be
25 concentrated and purified by any selected method, such as by Ni^{2+} -chelate affinity chromatography.

The desired protein or antibody may also be expressed in CHO and/or COS cells by a transient expression procedure or in CHO cells by another stable expression procedure.

30 Stable expression in CHO cells is performed using the following procedure. The proteins are expressed as an IgG construct (immunoadhesin), in which the coding sequences for the soluble forms (*e.g.* extracellular domains) of the respective proteins

are fused to an IgG1 constant region sequence containing the hinge, CH2 and CH2 domains and/or is a poly-His tagged form.

Following PCR amplification, the respective DNAs are subcloned in a CHO expression vector using standard techniques as described in Ausubel *et al.*, *Current*
5 *Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). CHO expression vectors are constructed to have compatible restriction sites 5' and 3' of the DNA of interest to allow the convenient shuttling of cDNA=s. The vector used expression in CHO cells is as described in Lucas *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 24:9 (1774-1779 (1996), and uses the SV40 early promoter/enhancer to drive expression of the
10 cDNA of interest and dihydrofolate reductase (DHFR). DHFR expression permits selection for stable maintenance of the plasmid following transfection.

Twelve micrograms of the desired plasmid DNA is introduced into approximately 10 million CHO cells using commercially available transfection reagents Superfect⁷ (Quiagen), Dosper⁷ or Eugene⁷ (Boehringer Mannheim). The
15 cells are grown as described in Lucas *et al.*, *supra*. Approximately 3×10^7 cells are frozen in an ampule for further growth and production as described below.

The ampules containing the plasmid DNA are thawed by placement into water bath and mixed by vortexing. The contents are pipetted into a centrifuge tube containing 10 mLs of media and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. The
20 supernatant is aspirated and the cells are resuspended in 10 mL of selective media (0.2 Φ m filtered PS20 with 5% 0.2 Φ m diafiltered fetal bovine serum). The cells are then aliquoted into a 100 mL spinner containing 90 mL of selective media. After 1-2 days, the cells are transferred into a 250 mL spinner filled with 150 mL selective growth medium and incubated at 37°C. After another 2-3 days, 250 mL, 500 mL and
25 2000 mL spinners are seeded with 3×10^5 cells/mL. The cell media is exchanged with fresh media by centrifugation and resuspension in production medium. Although any suitable CHO media may be employed, a production medium described in U.S. Patent No. 5,122,469, issued June 16, 1992 may actually be used. A 3L production spinner is seeded at 1.2×10^6 cells/mL. On day 0, the cell number and pH
30 is determined. On day 1, the spinner is sampled and sparging with filtered air is commenced. On day 2, the spinner is sampled, the temperature shifted to 33°C, and 30 mL of 500 g/L glucose and 0.6 mL of 10% antifoam (e.g., 35%

polydimethylsiloxane emulsion, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion) taken. Throughout the production, the pH is adjusted as necessary to keep it at around 7.2. After 10 days, or until the viability dropped below 70%, the cell culture is harvested by centrifugation and filtering through a 0.22 μ m filter. The filtrate was either stored
5 at 4°C or immediately loaded onto columns for purification.

For the poly-His tagged constructs, the proteins are purified using a Ni-NTA column (Qiagen). Before purification, imidazole is added to the conditioned media to a concentration of 5 mM. The conditioned media is pumped onto a 6 ml Ni-NTA column equilibrated at 4°C, in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl
10 and 5 mM imidazole at a flow rate of 4-5 ml/min. After loading, the column is washed with additional equilibration buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein is subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -
15 80°C.

Immunoadhesin (Fc-containing) constructs are purified from the conditioned media as follows. The conditioned medium is pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which had been equilibrated in 20 mM Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column is washed extensively with equilibration buffer before
20 elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein is immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 μ L of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein is subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity is assessed by SDS polyacrylamide gels and by N-terminal amino acid sequencing by Edman
25 degradation.

EXAMPLE 11

Expression of protein or antibodies in Yeast

The following method describes recombinant expression of the desired protein
30 or antibody in yeast.

First, yeast expression vectors are constructed for intracellular production or secretion of the desired protein or antibody from the ADH2/GAPDH promoter. DNA

encoding desired protein or antibody and the promoter is inserted into suitable restriction enzyme sites in the selected plasmid in order to direct intracellular expression. For secretion, DNA encoding the desired protein or antibody can be cloned into the selected plasmid, together with DNA encoding the ADH2/GAPDH
5 promoter, a native signal peptide or other mammalian signal peptide, or, for example, a yeast alpha-factor or invertase secretory signal/leader sequence, and linker sequences (if needed) for expression of the desired protein or antibody.

Yeast cells, such as yeast strain AB110, can then be transformed with the expression plasmids described above and cultured in selected fermentation media.
10 The transformed yeast supernatants can be analyzed by precipitation with 10% trichloroacetic acid and separation by SDS-PAGE, followed by staining of the gels with Coomassie Blue stain.

The recombinant protein or antibody can subsequently be isolated and purified by removing the yeast cells from the fermentation medium by centrifugation and then
15 concentrating the medium using selected cartridge filters. The concentrate containing the recombinant protein or antibody may further be purified using selected column chromatography resins.

EXAMPLE 12

20 Expression of the Protein or Antibody in Baculovirus-Infected Insect Cells

The following method describes recombinant expression of the desired protein or antibody in Baculovirus-infected insect cells.

The sequence coding for the desired protein or antibody is fused upstream of an epitope tag contained within a baculovirus expression vector. Such epitope tags
25 include poly-his tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pVL1393 (Novagen). Briefly, the sequence encoding the desired portion of the protein or antibody, such as the sequence encoding the extracellular domain of a transmembrane protein or the sequence encoding the mature protein if
30 the protein is extracellular is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme

sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector.

Recombinant baculovirus is generated by co-transfecting the above plasmid and BaculoGold™ virus DNA (Pharmingen) into *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711) using lipofectin (commercially available from GIBCO-BRL). After 4-5 days of incubation at 28°C, the released viruses are harvested and used for further amplifications. Viral infection and protein expression are performed as described by O'Reilley *et al.*, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

Expressed poly-his tagged protein or antibody can then be purified, for example, by Ni²⁺-chelate affinity chromatography as follows. Extracts are prepared from recombinant virus-infected Sf9 cells as described by Rupert *et al.*, *Nature*, 362:175-179 (1993). Briefly, Sf9 cells are washed, resuspended in sonication buffer (25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 10% glycerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), and sonicated twice for 20 seconds on ice. The sonicates are cleared by centrifugation, and the supernatant is diluted 50-fold in loading buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.8) and filtered through a 0.45 Φ m filter. A Ni²⁺-NTA agarose column (commercially available from Qiagen) is prepared with a bed volume of 5 mL, washed with 25 mL of water and equilibrated with 25 mL of loading buffer. The filtered cell extract is loaded onto the column at 0.5 mL per minute. The column is washed to baseline A₂₈₀ with loading buffer, at which point fraction collection is started. Next, the column is washed with a secondary wash buffer (50 mM phosphate; 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 6.0), which elutes nonspecifically bound protein. After reaching A₂₈₀ baseline again, the column is developed with a 0 to 500 mM Imidazole gradient in the secondary wash buffer. One mL fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE and silver staining or Western blot with Ni²⁺-NTA-conjugated to alkaline phosphatase (Qiagen). Fractions containing the eluted His₁₀-tagged protein or antibody are pooled and dialyzed against loading buffer.

Alternatively, purification of the IgG tagged (or Fc tagged) protein or antibody can be performed using known chromatography techniques, including for instance, Protein A or protein G column chromatography.

EXAMPLE 13Preparation of Antibodies

This example illustrates preparation of monoclonal antibodies which can
5 specifically bind the protein of interest or the desired antigen.

Techniques for producing the monoclonal antibodies are known in the art and
are described, for instance, in Goding, *supra*. Immunogens that may be employed
include purified desired protein or target antibody, fusion proteins containing the
desired protein or target antigen, and cells expressing such recombinant protein or
10 antigen on the cell surface. Selection of the immunogen can be made by the skilled
artisan without undue experimentation.

Mice, such as Balb/c, are immunized with the the desired protein or target
antigen immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant and injected
subcutaneously or intraperitoneally in an amount from 1-100 micrograms.
15 Alternatively, the immunogen is emulsified in MPL-TDM adjuvant (Ribi
Immunochemical Research, Hamilton, MT) and injected into the animal's hind foot
pads. The immunized mice are then boosted 10 to 12 days later with additional
immunogen emulsified in the selected adjuvant. Thereafter, for several weeks, the
mice may also be boosted with additional immunization injections. Serum samples
20 may be periodically obtained from the mice by retro-orbital bleeding for testing in
ELISA assays to detect antibodies direct to the desired protein or antigen.

After a suitable antibody titer has been detected, the animals "positive" for
antibodies can be injected with a final intravenous injection of the desired protein or
target antigen. Three to four days later, the mice are sacrificed and the spleen cells
25 are harvested. The spleen cells are then fused (using 35% polyethylene glycol) to a
selected murine myeloma cell line such as P3X63AgU.1, available from ATCC, No.
CRL 1597. The fusions generate hybridoma cells which can then be plated in 96 well
tissue culture plates containing HAT (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine)
medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell
30 hybrids.

The hybridoma cells will be screened in an ELISA for reactivity against the desired protein or target antigen. Determination of "positive" hybridoma cells secreting the such monoclonal antibodies is within the skill in the art.

The positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic
5 Balb/c mice to produce ascites containing such monoclonal antibodies. Alternatively, the hybridoma cells can be grown in tissue culture flasks or roller bottles. Purification of the monoclonal antibodies produced in the ascites can be accomplished using ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of
10 antibody to protein A or protein G can be employed.

EXAMPLE 14

Purification of the Desired Protein Using Specific Antibodies

The desired protein, in either native or recombinant form, may be purified by
15 a variety of standard techniques in the art of protein purification. For example, pro-peptide, mature polypeptide, or pre-polypeptide forms of the desired protein may be purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for the desired protein. In general, an immunoaffinity column is constructed by covalently coupling the antibody that specifically binds the desired protein to an activated
20 chromatographic resin.

Polyclonal immunoglobulins are prepared from immune sera either by precipitation with ammonium sulfate or by purification on immobilized Protein A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Likewise, monoclonal antibodies are prepared from mouse ascites fluid by ammonium sulfate precipitation or
25 chromatography on immobilized Protein A. Partially purified immunoglobulin is covalently attached to a chromatographic resin such as CnBr-activated SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology). The antibody is coupled to the resin, the resin is blocked, and the derivative resin is washed according to the manufacturer's instructions.

30 Such an immunoaffinity column is utilized in the purification of the desired protein by preparing a fraction from cells expressing it in a soluble form. This preparation is derived by solubilization of the whole cell or of a subcellular fraction

obtained via differential centrifugation by the addition of detergent or by other methods well known in the art. Alternatively, soluble protein containing a signal sequence may be secreted in useful quantity into the medium in which the cells are grown.

- 5 The solublized preparation containing the desired protein is passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of the desired protein (*e.g.*, high ionic strength buffers in the presence of detergent). Then, the column is eluted under conditions that disrupt antibody to protein binding (*e.g.*, a low pH buffer such as approximately pH 2-3, or a
- 10 high concentration of a chaotrope such as urea or thiocyanate ion), and the desired protein is then collected.

~~CS~~ ~~98~~ 99

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A stable, liquid formulation of low turbidity comprising (a) a protein or antibody in an amount of 100 to 260 mg/ml, (b) arginine-HCl in an amount of 50 to 200 mM, (c) histidine in an amount of 10 to 100 mM, (d) polysorbate in an amount of 0.01 to 0.1%, where the formulation further has a pH ranging from 5.5 to 7.0, a kinematic viscosity of about 50 cs or less and osmolarity ranging from 200 mOsm/kg to 450 mOsm/kg.
2. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of protein or antibody ranges from 120 mg/ml to 260 mg/ml.
3. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of protein or antibody ranges from 150 mg/ml to 260 mg/ml.
4. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of protein or antibody ranges from 180 mg/ml to 260 mg/ml.
5. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of protein or antibody ranges from 200 mg/ml to 260 mg/ml.
6. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of protein or antibody is about 150 mg/ml.
7. The formulation of Claim 1, wherein the osmolarity ranges from 250 mOsm/kg to 350 mOsm/kg.
8. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of arginine-HCl ranges from 100 mg/ml to 200 mg/ml.
9. A stable, liquid formulation of low turbidity comprising (a) an anti-IgE monoclonal antibody in an amount of 100 to 260 mg/ml, (b) arginine-HCl in an

amount of 50 to 200 mM, (c) histidine in an amount of 10 to 100 mM, (d) polysorbate in an amount of 0.01 to 0.1%, where the formulation further has a pH ranging from 5.5 to 7.0, a kinematic viscosity of about 50 cs or less and osmolarity ranging from 200 mOsm/kg to 450 mOsm/kg.

5

10. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of protein or antibody ranges from 120 mg/ml to 260 mg/ml.

11. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of protein or
10 antibody ranges from 150 mg/ml to 260 mg/ml.

12. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of protein or antibody ranges from 180 mg/ml to 260 mg/ml.

13. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of protein or
15 antibody ranges from 200 mg/ml to 260 mg/ml.

14. The formulation of Claim 1, wherein the concentration of protein or antibody is about 150 mg/ml.

20

15. The formulation of Claim 1, wherein the osmolarity ranges from 250 mOsm/kg to 350 mOsm/kg.

16. The formulation of Claim 1, where the anti-IgE antibody is selected
25 from the group consisting of rhuMAbE25, rhuMAbE26 and Hu-901.

17. The formulation of Claim 1, wherein the anti-IgE antibody is rhuMAbE25.

18. The formulation of Claim 1, wherein the anti-IgE antibody is
30 rhuMAbE26.

169 101

19. The formulation of Claim 1, wherein the anti-IgE antibody is Hu-901.
20. A stable, liquid formulation of low turbidity comprising (a) an anti-IgE antibody in an amount of about 150 mg/ml, (b) arginine-HCl in an amount of 200 mM, (c) histidine in an amount of 20 mM, (d) polysorbate in an amount of 0.02%, where the formulation further has a pH of 6.0.
21. The formulation of Claim 20, wherein the anti-IgE antibody is E25.
- 10 22. An article of manufacture comprising a container enclosing the formulation of Claim 1.
23. The article of manufacture of Claim 22, wherein the container is a syringe.
- 15 24. The article of manufacture of Claim 23, wherein the syringe is further contained within an injection device.
25. The article of manufacture of Claim 24, wherein the injection device is an auto-injector.
- 20 26. The formulation of Claim 1, wherein said formulation is reconstituted.
27. The formulation of Claim 26, wherein the protein or antibody concentration in said reconstituted formulation is about 2-40 times greater than the concentration prior to lyophilization.
- 25 28. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20.
- 30

29. The method of Claim 28, wherein the IgE-mediated disorder is selected from the group consisting of allergic rhinitis, asthma, allergic asthma, non-allergic asthma, atopic dermatitis and gastroenteropathy.

5 30. The method of Claim 28, wherein the IgE-mediated disorder is allergic rhinitis.

 31. The method of Claim 28, wherein the IgE-mediated disorder is allergic asthma.

10

 32. The method of Claim 28, wherein the IgE-mediated disorder is asthma.

 33. The method of Claim 28, wherein the IgE-mediated disorder is atopic dermatitis.

15

 34. The method of Claim 28, wherein the IgE-mediated disorder is selected from the group consisting of hypersensitivity, allergic bronchopulmonary aspergillosis, parasitic diseases, interstitial cystitis, hyper-IgE syndrome, ataxia-telangiectasia, Wiskott-Akdrich syndrome, thymic alymphoplasia, IgE myeloma and graft-versus-host reaction.

20

 35. The method of Claim 28 wherein the IgE-mediated disorder is hypersensitivity.

25 36. The method of Claim 35, wherein the hypersensitivity disorder is selected from the group consisting of anaphylaxis, urticaria and food allergy.

 37. The method of Claim 36, wherein hypersensitivity disorder is food allergy.

30

 38. The method of Claim 37, wherein the food allergy results from exposure to a legume.

39. The method of Claim 38, wherein the legume is a peanut.

5 40. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with an antihistamine.

10 41. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with the administration of an antihistamine.

15 42. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with a bronchodilator.

43. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with the administration of a bronchodilator.

20 44. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with a glucocorticoid.

25 45. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with the administration of a glucocorticoid.

30 46. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with a glucocorticoid.

~~104~~ 98 104

47. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with the administration of a glucocorticoid.

5 48. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with the administration of allergen desensitization.

10 49. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with an NSAID.

15 50. A method of treating an IgE-mediated disorder comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the formulation of Claim 20 in combination with the administration of an NSAID.

~~105~~ 99 105

HIGH CONCENTRATION ANTIBODY AND PROTEIN FORMULATIONS

Abstract of the Disclosure

5 The present application relates to highly concentrated antibody and protein formulations with reduced viscosity that are stable, relatively isotonic and are of low turbidity. The formulations are particularly suitable for subcutaneous administration. The application further describes articles of manufacture containing such formulations and method for using them to treat disorders treatable by the formulated
10 antibody or protein.

106

Sequence Listing

<110> Genentech, Inc.

<120> High Concentration Antibody and Protein Formulations

<130> P2026R1-PCT

<140> PCT/US2004/009613

<141> 2004-03-29

<150> US 60/460,659

<151> 2003-04-04

<160> 6

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> E25, light chain

<400> 1

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

107

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 2
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> E26, light chain

<400> 2
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

~~108~~

108

<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Hu-901, light chain

<400> 3
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
20 25 30
Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45
Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Ser Asp Ser Trp Pro Thr 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> 4
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> E25, heavy chain

<400> 4

109

109

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	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	20	25	30	
Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	35	40	45	
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	50	55	60	
Asn	Pro	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His	95	100	105	
Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	110	115	120	
Ser	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	Val	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	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	260	265	270	
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	275	280	285	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	290	295	300	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	305	310	315	

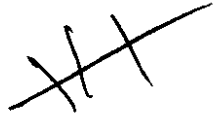
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
				320					325					330
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				335					340					345
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
				350					355					360
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
				365					370					375
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
				380					385					390
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
				395					400					405
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				410					415					420
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
				425					430					435
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
				440					445					450

Lys

<210> 5
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> E26, heavy chain

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




Ser	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	Val	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	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
				260					265					270	
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
				275					280					285	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
				290					295					300	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
				305					310					315	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				320					325					330	
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
				335					340					345	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	
				350					355					360	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	
				365					370					375	
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
				380					385					390	
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	
				395					400					405	
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
				410					415					420	
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
				425					430					435	

112

112

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445 450

Lys

<210> 6

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Hu-901, heavy chain

<400> 6

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

114

P2026R1

1 / 7

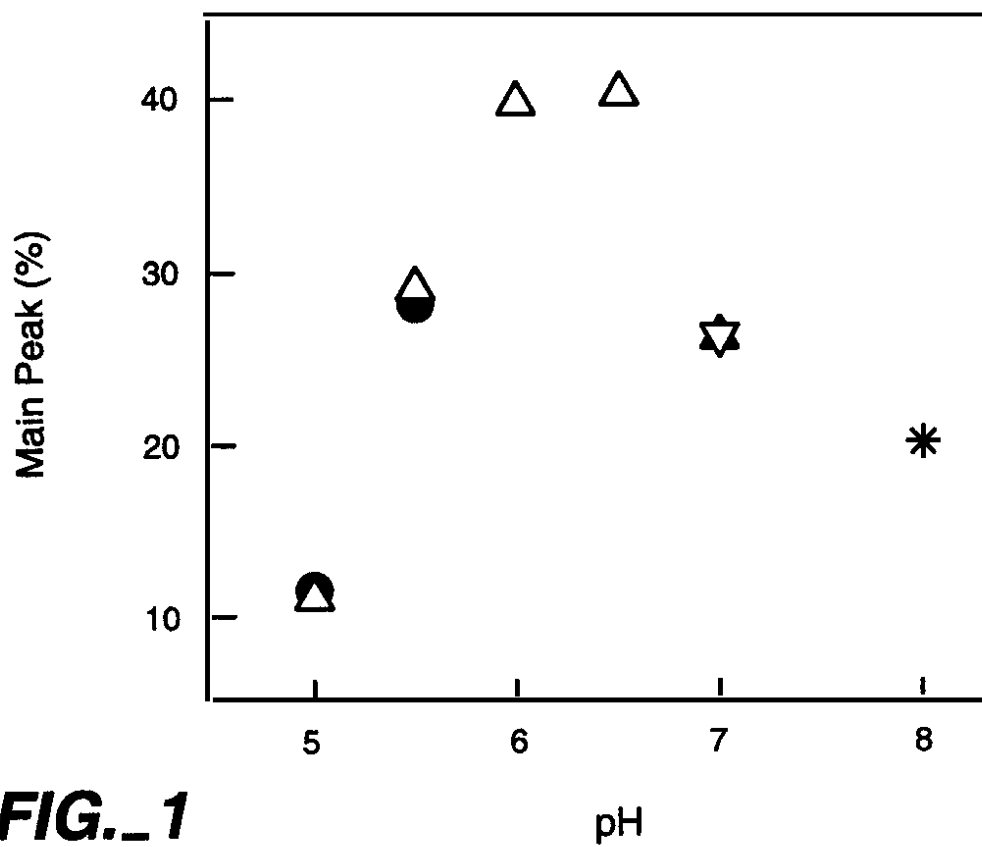


FIG._1

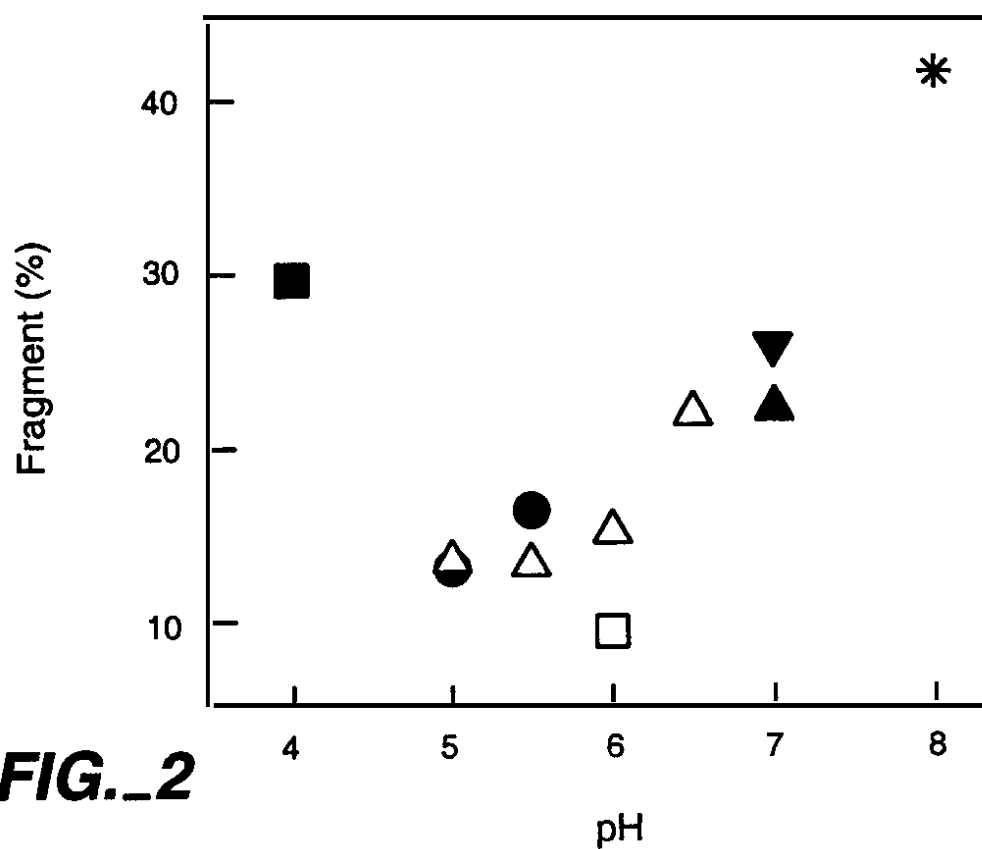


FIG._2

~~115~~

P2026R1

2 / 7

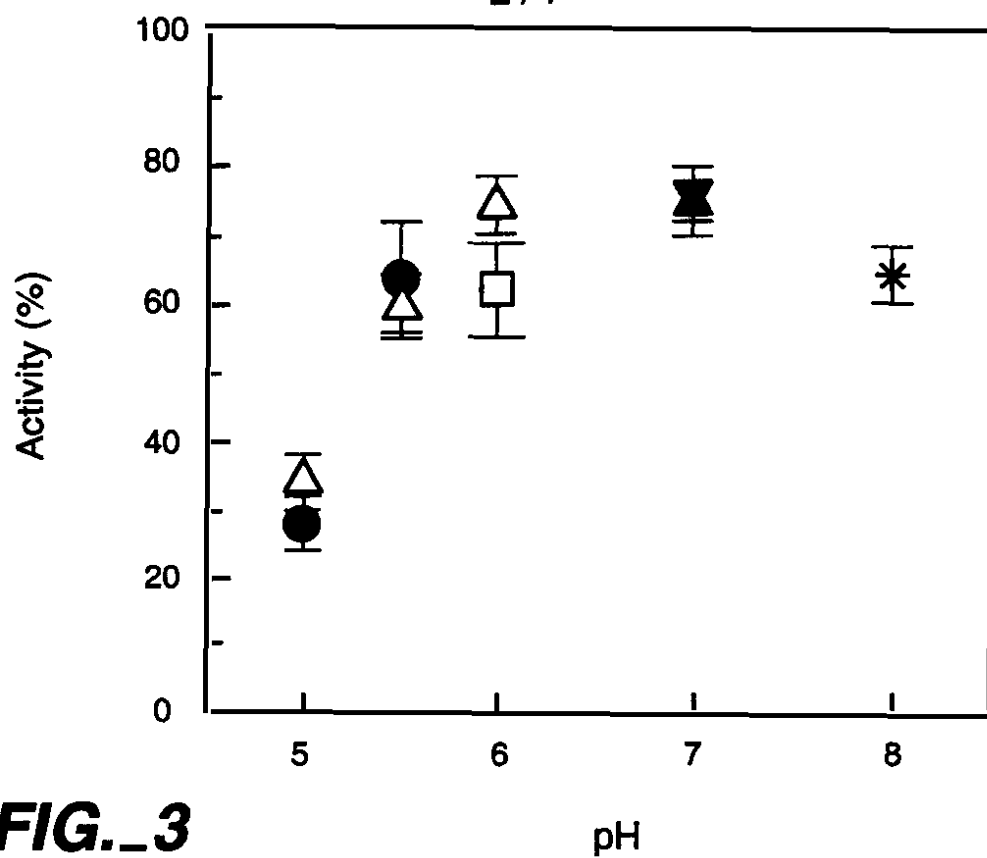


FIG._3

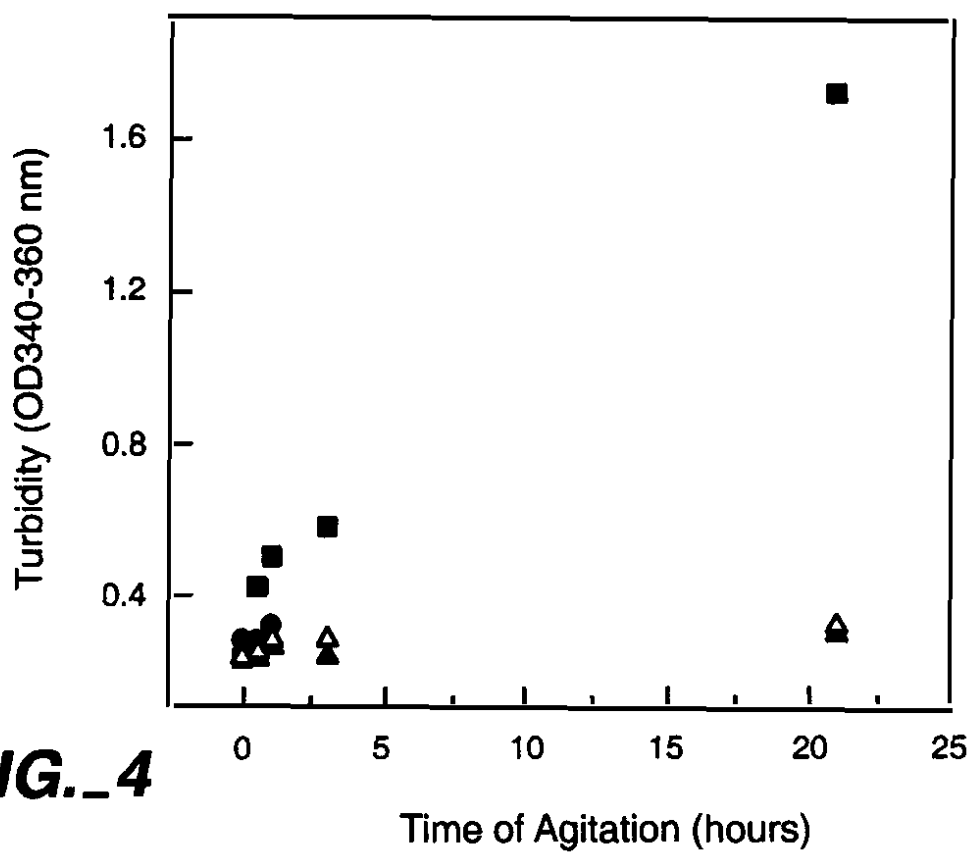


FIG._4

116

P2026R1

3 / 7

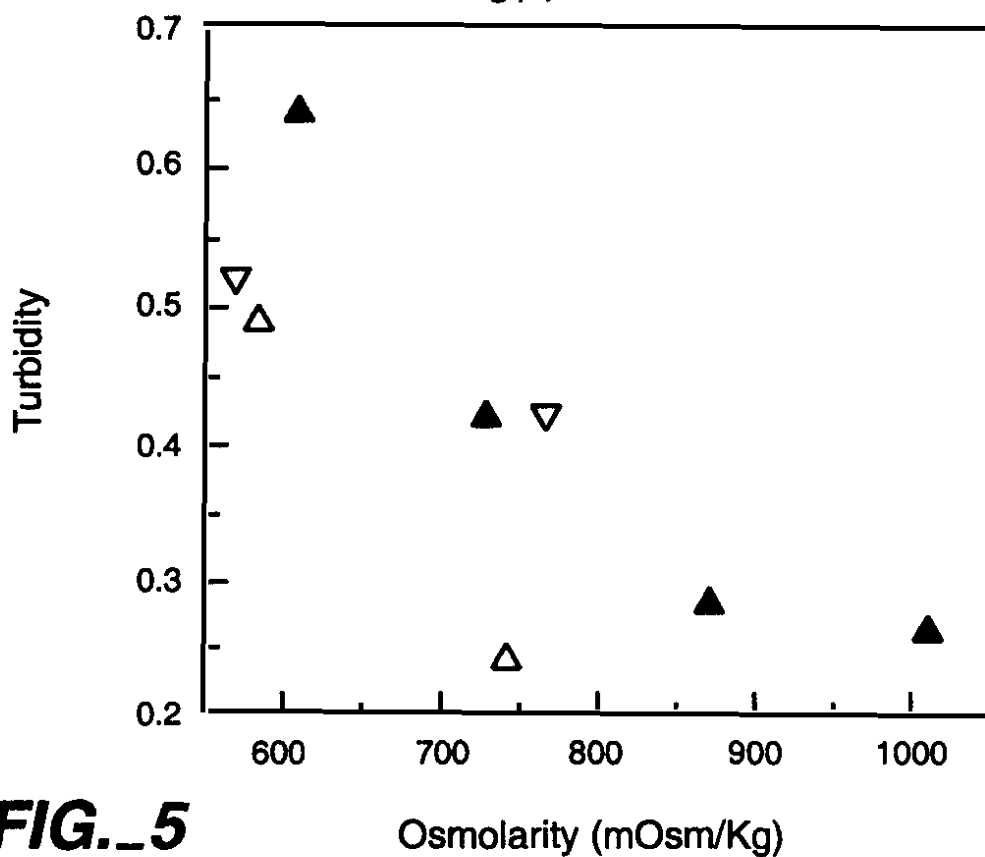


FIG. 5

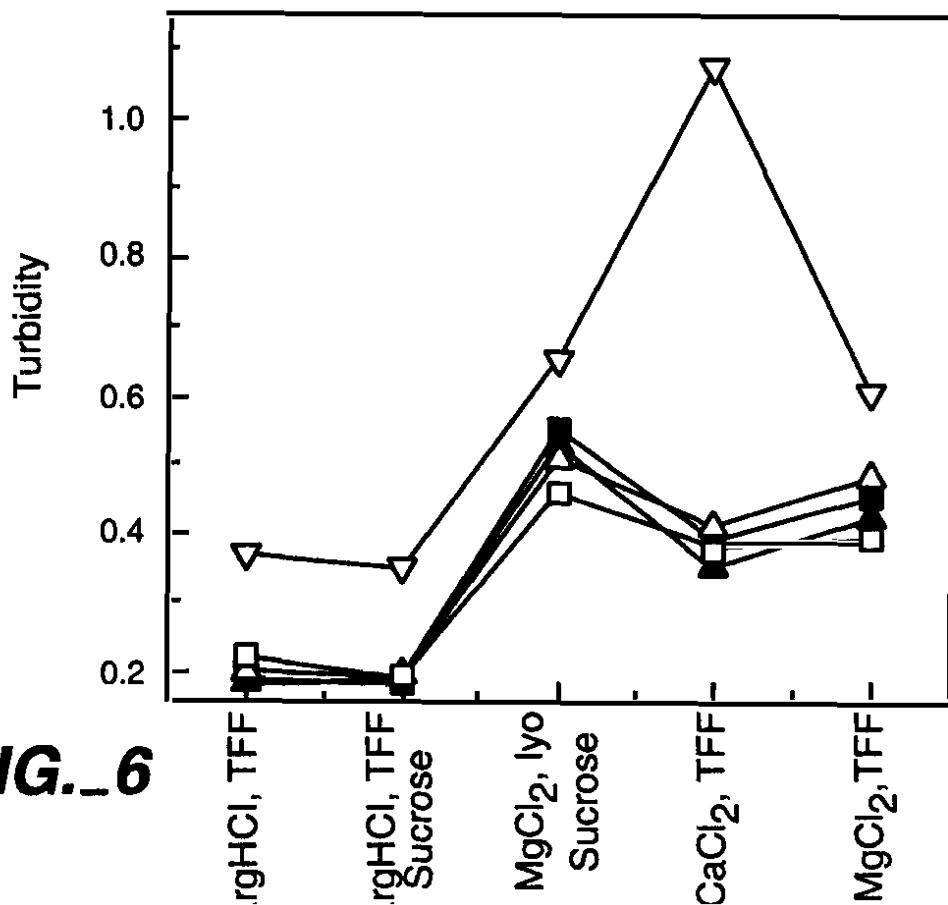


FIG. 6

~~7/7~~

P2026R1

4 / 7

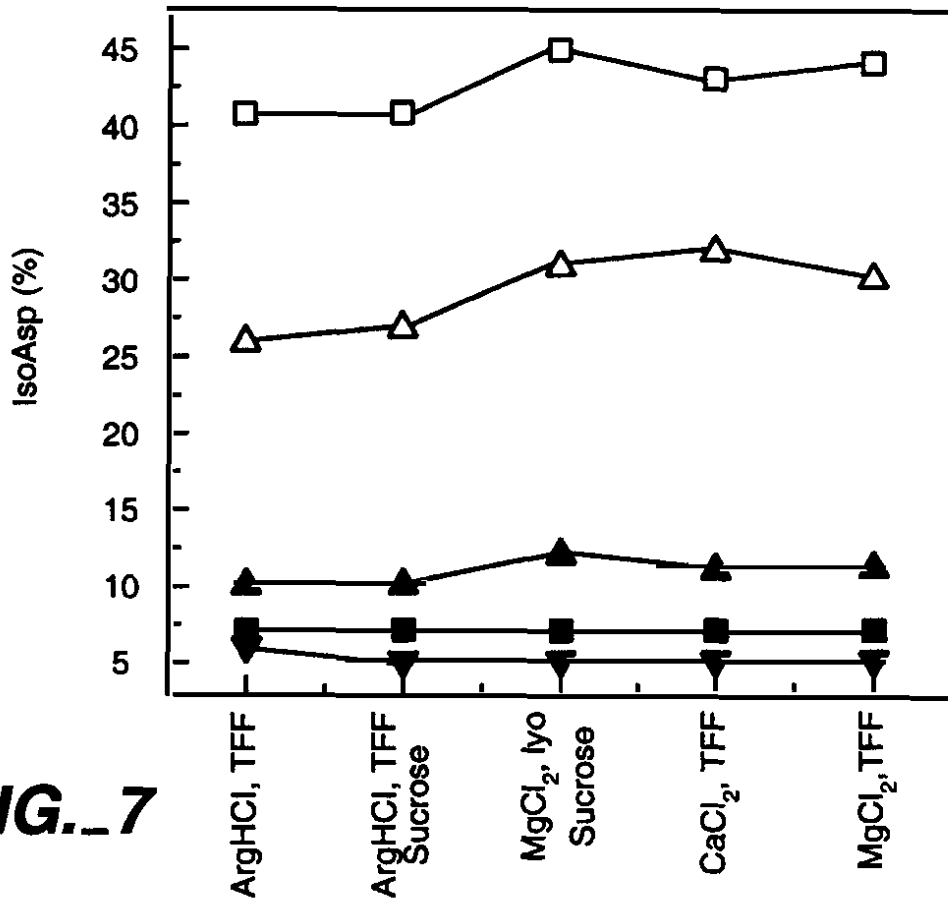


FIG._7

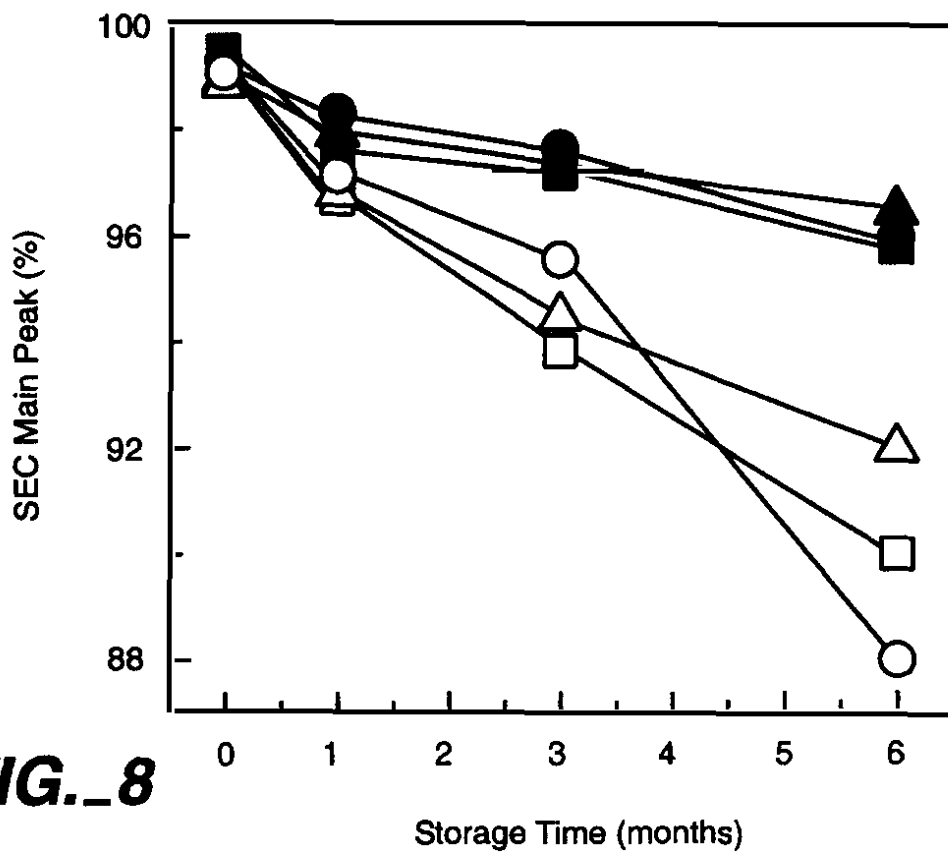


FIG._8

7/18

118

P2026R1

5 / 7

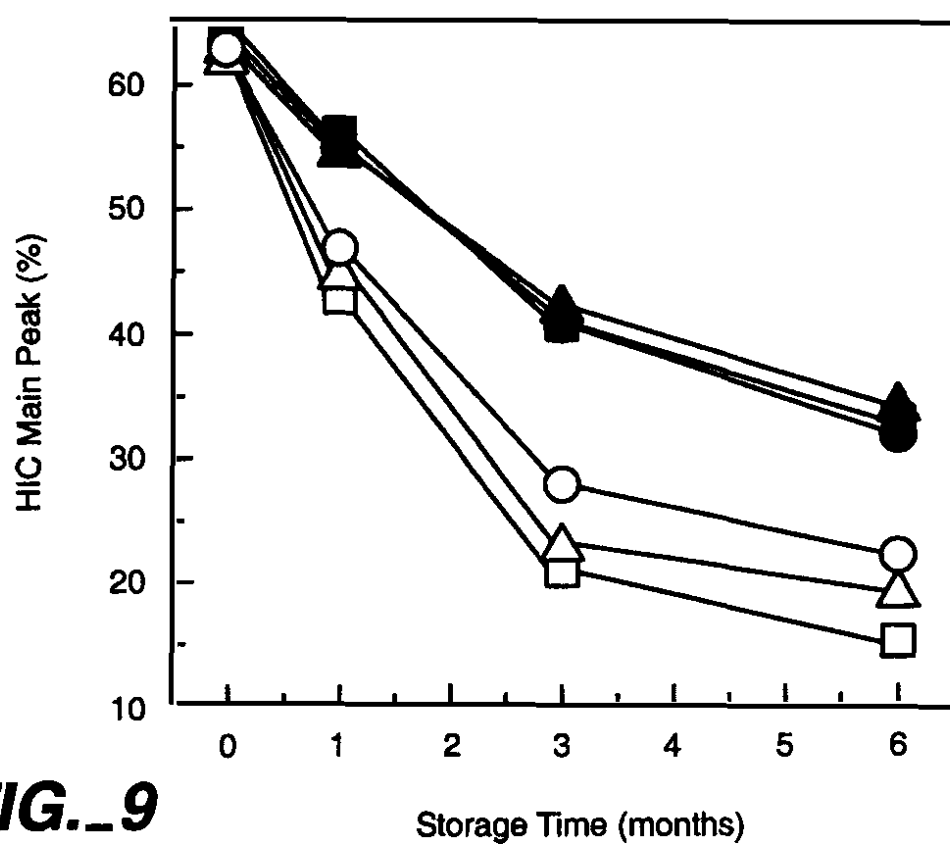


FIG._9

Anti-IgE Antibodies: Light Chain (V_L and C_L Domains)

	10	20	30	40	50	60	70	80
E25	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[<u>RASQSV</u> <u>YDGD</u> <u>SYMN</u>]	WY	QOKPGKAPKL	LIY[<u>AASYLE</u>]	GVPSRFGSG	SGTDFTLTIS
E26	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[<u>RASKVD</u> <u>GGGD</u> <u>SYLN</u>]	WY	QOKPGKAPKL	LIY[<u>AASYLE</u>]	GVPSRFGSG	SGTDFTLTIS
Hu-901	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[<u>RASQSV</u> <u>YDGD</u> <u>SYMN</u>]	WY	QOKPGKAPKL	LIY[<u>AASYLE</u>]	GVPSRFGSG	SGTDFTLTIS
	90	100	110	C _L starts				
E25	SLQPEDFATY	YC[<u>QOSHEDPY</u> T]	FGQGTKVEI	KRT	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD			
E26	SLQPEDFATY	YC[<u>QOSHEDPY</u> T]	FGQGTKVEI	KRT	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD			
Hu-901	SLQPEDFATY	YC[<u>QOSHEDPY</u> T]	FGQGTKVEI	KRT	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD			
E25	SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC							
E26	SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC							
Hu-901	SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC							

FIG. 10A

6 / 7
P2026r1

2/3

Anti-IgE Antibodies: Heavy Chain (V_H and C_H Domains)

	10	20	30	40	50	a	60	70	80	90						
:25	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVS	<u>GYSTI S IGYSWNW</u>	IRQ	APGKGLEWVA	[<u>SITYDGS</u> TNY NPSVKG]	RITI	SRDDSKNTFY	LQMNSLRAED						
:26	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVS	<u>GYSTI S IGYSWNW</u>	IRQ	APGKGLEWVA	[<u>SITYDGS</u> TNY NPSVKG]	RITI	SRDDSKNTFY	LQMNSLRAED						
u-901	<u>QVQLVQSGAE</u>	<u>VKRPQAASVKV</u>	<u>SCKASGVTF</u>	<u>S MMLLEW</u>	IRQ	APGKGLEWVG	<u>EISPGTFTNY</u>	<u>NEKPKA</u>	<u>RAIF</u>	<u>TADISNTAY</u>	<u>MELSLRAED</u>					
	100	110ab	120	C _H starts												
:25	TAVYYCAR	[<u>GS HYFGHWHFAV</u>]	WGQGT	LVTVSS	ASTKG	PSVFP	PLAPSSK	STSGG	TAA	LGCLVKDYF	PEPVT	VS	WNSGALT	SGVHTF	PAVLQ	SSGLYSLS
:26	TAVYYCAR	[<u>GS HYFGHWHFAV</u>]	WGQGT	LVTVSS	ASTKG	PSVFP	PLAPSSK	STSGG	TAA	LGCLVKDYF	PEPVT	VS	WNSGALT	SGVHTF	PAVLQ	SSGLYSLS
u-901	TAVYYCAR	[<u>FS HFS</u> <u>SNYDYFDY</u>]	WGQGT	LVTVSS	ASTKG	PSVFP	PLAPSSK	STSGG	TAA	LGCLVKDYF	PEPVT	VS	WNSGALT	SGVHTF	PAVLQ	SSGLYSLS
:25	VVTVPSSSLGTQ	TYICNVNHKPSNTK	VDKKVEPKSCDK	THTCPPCPAPELL	GGPSVFLF	PPKPKDTL	MI	SRTPEV	TCVVVDVSHED	PEVKFNWYVDGVE						
:26	VVTVPSSSLGTQ	TYICNVNHKPSNTK	VDKKVEPKSCDK	THTCPPCPAPELL	GGPSVFLF	PPKPKDTL	MI	SRTPEV	TCVVVDVSHED	PEVKFNWYVDGVE						
u-901	VVTVPSSSLGTQ	TYICNVNHKPSNTK	VDKKVEPKSCDK	THTCPPCPAPELL	GGPSVFLF	PPKPKDTL	MI	SRTPEV	TCVVVDVSHED	PEVKFNWYVDGVE						
:25	VHNAKTPREEQYN	STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE														
:26	VHNAKTPREEQYN	STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE														
u-901	VHNAKTPREEQYN	STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE														
:25	SNGQPENNYKTT	PPVLDS	SGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV	FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK												
:26	SNGQPENNYKTT	PPVLDS	SGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV	FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK												
u-901	SNGQPENNYKTT	PPVLDS	SGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV	FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK												

7/7

P2026H1

FIG. 10B

(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
28 de Octubre de 2004 (28.10.2004)

(10) Número de Publicación Internacional

PCT WO 2004/091658 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 39/395, 47/18, 47/06 // C07K 16/18

Jun [US/US]: 1108 Glacier Avenue, Pacifica, CA 94044 (US). SHIRE, Steven [US/US]: 210 Sylvan Way, Emerald Hills, CA 94062 (US).

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2004/009613

(74) Agentes: SVOBODA, Craig G. et al.; GENENTECH, INC., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).

(22) Fecha de Presentación Internacional:
29 de marzo de 2004 (29.03.2004)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/460,659 4 de abril de 2003 (04.04.2003) US

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de US): GENENTECH, INC [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).

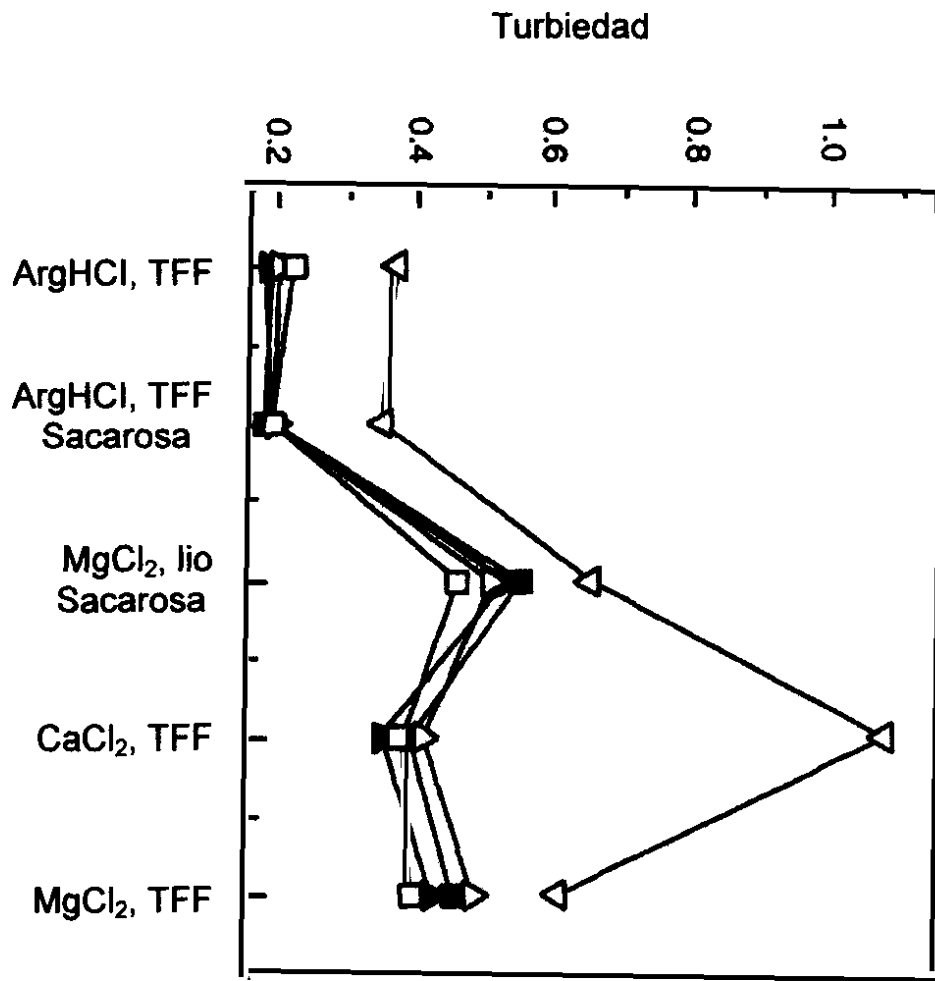
(72) Inventores, e

(84) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible):

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente): LIU,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Título: FORMULACIONES DE PROTEÍNA Y ANTICUERPO DE ALTA CONCENTRACION



(57) Extracto: La presente solicitud se relaciona con formulaciones de anticuerpo y proteína altamente concentradas, con viscosidad reducida, que son estables, relativamente isotónicas y de baja turbiedad. Las formulaciones son particularmente apropiadas para administración subcutánea. La solicitud describe además artículos de manufactura que contienen tales formulaciones y métodos para usarlas para tratar trastornos susceptibles de tratamiento por el anticuerpo o proteína formulada. Las formulaciones comprenden HCl de arginina, histidina y polisorbato.

WO 2004/091658 A1

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— antes del vencimiento del tiempo límite para modificar las reivindicaciones y para volverse a publicar en el caso de recibo de modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, remítase a las "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada edición regular del Boletín Oficial PCT.

Publicado:

— con informe internacional de búsqueda

FORMULACIONES DE PROTEÍNA Y ANTICUERPO DE ALTA CONCENTRACIÓN

Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

Esta invención corresponde a formulaciones con alta concentración de anticuerpos, que son particularmente apropiadas para administración subcutánea. La invención provee además formulaciones líquidas estables, con alta concentración (*por ej.*, ≥ 100 mg/ml proteína).

Descripción del Arte Relacionado

Existe una demanda significativa de formulaciones líquidas de anticuerpo con alta concentración. No obstante, las formulaciones de proteína con alta concentración plantean varios problemas. Un problema es la inestabilidad debido a la formación de particulados. Con preparaciones liofilizadas reconstituidas para generar formulaciones líquidas, este problema se ha abordado mediante el uso de tensoactivos (*por ej.*, un polisorbato), pero los tensoactivos son inapropiados para formulaciones líquidas, porque dificultan aún más el procesamiento. Más aún, los tensoactivos no reducen en mayor proporción la viscosidad incrementada, causada como resultado de numerosas interacciones intermoleculares derivadas de la naturaleza macromolecular de los anticuerpos.

Aunque se ha demostrado que los tensoactivos reducen significativamente el grado de formación de particulados de proteínas, no abordan el problema de la viscosidad incrementada que dificulta la manipulación y administración de formulaciones de anticuerpo concentradas. Los anticuerpos tienden a formar soluciones viscosas con alta concentración debido a su naturaleza macromolecular y a su potencial de interacciones intermoleculares. Más aún, a menudo se usan azúcares farmacéuticamente aceptables en grandes cantidades como estabilizantes. Tales azúcares pueden intensificar las interacciones intermoleculares,

aumentando en esta forma la viscosidad de la formulación. Las formulaciones altamente viscosas son difíciles de fabricar, introducir en una jeringa e inyectar subcutáneamente. El empleo de fuerza en la manipulación de las formulaciones viscosas lleva a una excesiva formación de espuma, que puede conducir a la desnaturalización e inactivación de los biológicos activos. No existe una solución satisfactoria a este problema.

Aunque el arte previo indica numerosos ejemplos de excipientes que pueden emplearse apropiadamente para crear formulaciones farmacéuticas, se han formulado exitosamente muy pocas proteínas por encima de 100 mg/ml, o se han descrito técnicas para hacerlo.

Los solicitantes han descubierto que la arginina, específicamente HCl de arginina, es particularmente apropiada para formulaciones de proteína o anticuerpo con alta concentración.

Formulaciones de proteína liofilizadas, isotónicas, estables se divulgan en la Publicación PCT WO 97/04801, publicada el 13 de febrero de 1997, cuya completa divulgación se incorpora aquí de manera expresa por referencia. Las formulaciones liofilizadas divulgadas pueden reconstituirse para generar formulaciones líquidas con alta concentración de proteína, sin pérdida aparente de estabilidad. No obstante, no se abordan los problemas potenciales asociados con la elevada viscosidad de las formulaciones reconstituidas. La agregación de proteína se ha reducido anteriormente mediante la adición de azúcares, pero, al hacerlo, se puede aumentar en forma dramática la viscosidad y la osmolaridad, haciendo así poco prácticos el procesamiento y el uso.

La solicitud PCT de los solicitantes, publicación WO02/30463, publicada el 18 de abril de 2002 divulga formulaciones con alta concentración de proteína, pero baja viscosidad obtenidas: 1) mediante pH bajo (alrededor de 4.0 a 5.3); 2) pH alto (alrededor de 6.5 a 12.0), ó 3) aumentando la saturación iónica total de la formulación por la adición de sales o tampones. No obstante, aunque la saturación iónica aumentada disminuye la viscosidad de la formulación (tal como con NaCl), puede resultar asimismo en una turbiedad aumentada de la solución, la cual se

asocia a menudo con la formación de partículas de proteína (*por ej.*, agregación). Por consiguiente, una formulación óptima con alta concentración de proteína tiene que superar los retos de estabilidad, viscosidad, osmolaridad y turbiedad.

Sumario de la Invención

La presente invención concierne a formulaciones de proteína o anticuerpo con alta concentración que son estables, y de baja viscosidad y turbiedad.)

En particular, la presente invención concierne a formulaciones de anticuerpo con alta concentración, de baja turbiedad, que comprenden proteína o anticuerpo (100 - 260 mg/ml), histidina (10 - 100 mM), HCl de arginina (50 - 200 mM) y polisorbato (0.01% -0.1%), que tienen un pH de 5.5 - 7.0, una viscosidad de 50 cs ó menos y una osmolaridad de 200 mOsm/kg - 450 mOsm/kg. Alternativamente, la proteína o anticuerpo en las formulaciones pueden variar de 120 - 260 mg/ml, alternativamente 150 - 260 mg/ml, alternativamente 180 -260 mg/ml, alternativamente 200 - 260 mg/ml de proteína o anticuerpo. Alternativamente la osmolaridad varía de 250 mOsm/kg - 350 mOsm/kg. Alternativamente, la concentración de HCl arginina varía de 100 - 200 mM, alternativamente 150 - 200 mM, alternativamente 180 - 200 mM.

Alternativamente, la presente invención concierne formulaciones de anticuerpo con alta concentración, de baja turbiedad, que comprenden anticuerpo (40 - 150 mg/ml), histidina (10 - 100 mM), azúcar (*por ej.*, trehalosa o sacarosa, 20 - 350 mM) y polisorbato (0.01% -0.1%).

En una incorporación particular, la invención provee una formulación que contiene altas concentraciones de proteínas de gran peso molecular, tales como anticuerpos o inmunoglobulinas. Los anticuerpos, por ejemplo, pueden ser anticuerpos dirigidos contra un antígeno predeterminado particular. En un aspecto específico, el antígeno es IgE (*por ej.*, rhuMAbE-25 y rhuMAbE-26 descrito en la Patente de los Estados Unidos 6,329,509 y WO 99/01556). Alternativamente, el anticuerpo anti-IgE puede

ser CGP-5101 (Hu-901) descrito en Corne y colaboradores, *J. Clin. Invest.* 99(5): 879-887 (1997), WO92/17207, y ATTC Depósitos No. BRL-10706 y 11130, 11131, 11132, 11133. Alternativamente, el antígeno puede incluir: las proteínas CD CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 y CD40; miembros de la familia de receptor HER tales como receptor EGF, receptor HER2, HER3 ó HER4; 2C4, 4D5, PSCA, LDP-2, moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina $\alpha v/\beta 3$ incluidas sus subunidades α - y β - (*por ej.*, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD 18 ó anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*, CTLA-4, y proteína C.

Las formulaciones de la presente invención pueden ser formulaciones farmacéuticas. En un aspecto específico, la formulación se administra subcutáneamente.

En todavía otra incorporación, la invención provee un método para el tratamiento, profiláctico o terapéutico, de un trastorno tratable por la proteína o anticuerpo formulados, que comprende administrar las formulaciones divulgadas aquí, que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína o anticuerpo. Tales formulaciones son particularmente útiles para administración subcutánea. En un aspecto específico, el trastorno es un trastorno mediado por IgE. En todavía otro aspecto específico, el trastorno mediado por IgE es rinitis alérgica, asma (*por ej.*, asma alérgica y asma no alérgica), dermatitis atópica, gastroenteropatía alérgica, hipersensibilidad (*por ej.*, anafilaxis, urticaria, alergias a los alimentos, *etc.*), aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasitarias, cistitis intersticial, síndrome hiper-IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoplasia tímica, mieloma IgE y reacción injerto-versus-huésped.

En todavía otra incorporación, la invención ofrece un artículo de manufactura que comprende un envase que encierra una formulación divulgada aquí. En un aspecto, el artículo de manufactura es una jeringa pre-ensugada. En todavía otro aspecto específico, la jeringa pre-ensugada está contenida adicionalmente en un dispositivo de inyección. En todavía

otro aspecto específico, el dispositivo de inyección es un auto-inyector.

Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1. Cromatografía de interacción hidrófoba de un anticuerpo monoclonal anti-IgE digerido con pepsina. Las muestras se formularon con pH y tampones diferentes: (●) 20 mM Acetato, (Δ) 20 mM Succinato, (▲) 20 mM Na₂HPO₄, (Λ) 20 mM K₂PO₄ y (*) tampón 20 mM Tris. Las muestras se almacenaron a 30 °C por 6 meses.

Figura 2. Cromatografía de exclusión de tamaño de un anticuerpo monoclonal anti-IgE almacenado a 40°C por 6 meses. Las muestras se formularon con pH y tampones diferentes: (■) 20 mM Glutamato, (●) 20 mM Acetato, (Δ) 20 mM Succinato, (□) 20 mM Histidina, (▲) 20 mM Na₂HPO₄, (▼) 20 mM K₂PO₄ y (*) tampón 20 mM Tris.

Figura 3. Actividad de un anticuerpo monoclonal anti-IgE almacenado a 30°C por 6 meses. Las muestras se formularon con pH y tampones diferentes: (●) 20 mM Acetato, (Δ) 20 mM Succinato, (□) 20 mM Histidina, (▲) 20 mM Na₂HPO₄, (▼) 20 mM K₂PO₄ y (*) tampón 20 mM Tris.

Figura 4. Efectos de Polisorbato 20 sobre la turbiedad del anticuerpo monoclonal anti-IgE acentuada. Las muestras contienen 100 mg/ml anticuerpo, 20 mM Succinato, 192 mM trehalosa y diferentes cantidades de polisorbato 20 a pH 6.0. Las concentraciones de polisorbato son (■) 0, (▲) 0.01%, (●) 0.02% y (Δ) 0.05%.

Figura 5. Turbiedad de un anticuerpo monoclonal anti-IgE a ~150 mg/ml con diferentes excipientes (▲) CaCl₂, (▼) MgCl₂ y (Δ) HCl de arginina.

Figura 6. Turbiedad de anticuerpo monoclonal anti-IgE a ~150 mg/ml con diferentes excipientes. Las muestras se almacenaron a (▲) -70 °C, (■) 2-8 °C, (▲) 15 °C, (Δ) 30 °C y (▽) 40 °C.

Figura 7. Análisis con cromatografía de interacción hidrófoba de anticuerpo monoclonal anti-IgE digerido con papaína. Las muestras se formularon a -150 mg/ml con varios de los excipientes y se almacenaron a (▼) -70 °C, (■) 2-8 °C, (▲) 15 °C, (Δ) 30 °C y (□) 40 °C.

Figura 8. Cromatografía de exclusión de tamaño de anticuerpo monoclonal anti-IgE a ~150 mg/ml en (■) 200 mM HCl de arginina, 23 mM histidina, pH 6.0 (▲) 182 mM HCl de arginina, 20 mM histidina, pH 6.0 (●) 182 mM HCl de arginina, 20 mM histidina, 91 mM sacarosa, pH 6.0 (□) 50 mM MgCl₂, 27 mg/ml trehalosa, 0.01% acetato, (Δ) 50 mM MgCl₂, 30 mM MgAc₂, 0.01% acetato, y (○) 50 mM MgCl₂, 45 mM MgAc₂, 0.01% acetato. Las muestras se almacenaron a 30 °C por 6 meses.

Figura 9. Análisis con cromatografía de interacción hidrófoba de anticuerpo monoclonal anti-IgE digerido con papaína. Las muestras indicadas se formularon en (■) 200 mM HCl de arginina, 23 mM histidina, (▲) 182 mM HCl de arginina, 20 mM histidina, (●) 182 mM HCl de arginina, 20 mM histidina, 91 mM sacarosa, (□) 50 mM MgCl₂, 27 mg/ml trehalosa, 0.01% acetato, (Δ) 50 mM MgCl₂, 30 mM MgAc₂, 0.01% acetato y (○) 50 mM MgCl₂, 45 mM MgAc₂, 0.01% acetato. Las muestras se almacenaron a 30 °C por 6 meses.

Figura 10. Muestra una comparación de secuencias de longitud completa de cadenas constantes y variables) de los anticuerpos anti-IgE E25, E26 y Hu-901. Las regiones CDR de Hu-901 se muestran con una subraya. Para E25 y E26, las regiones CDR como se definen por Chothia se muestran en negrilla, mientras que las regiones CDR, como se definen por Kabat, se resaltan con paréntesis. Figura 10A muestra las secuencias de cadena ligera

de E25, E26 y Hu-901 (SEQ ID NOS: 1-3), mientras la Figura 10B muestra las secuencias de cadena pesada de E25, E26 y Hu-901 (SEQ ID NOS:4-6).

Descripción Detallada de la Incorporación Preferida

I. Definiciones

Por "proteína" se da a entender una secuencia de aminoácidos cuya longitud de cadena es suficiente para producir los niveles más altos de estructura terciaria y/o cuaternaria. Por consiguiente, las proteínas se distinguen de los "péptidos", que son también moléculas a base de aminoácidos, en que no tienen tal estructura. Por lo general, una proteína para uso especificado aquí tendrá un peso molecular de por lo menos alrededor de 15-20 kD, preferiblemente por lo menos alrededor de 20 kD.

Ejemplos de proteínas comprendidas en la definición incluyen proteínas mamíferas, tales como, *por ej.*, somatotropina, incluidas la somatotropina humana y la somatotropina bovina; factor liberador de la somatotropina; paratirina; tirotropina; lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; proinsulina; folitropina; calcitonina; lutropina; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIC, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético atrial; tensoactivo del pulmón; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa o activador de plaminógeno tipo tisular (t-PA, *por ej.*, Activase[®], TNKase[®], Retevase[®]); bombazina; trombina; factor- α y - β de necrosis tumoral; encefalinasa; RANTES (linfocito T regulado normalmente por activación, expresado y segregado); proteína inflamatoria de macrófago humano (MIP-1- α); albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora de Müller; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorelaxina; péptido asociado con la gonadotropina de ratón; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF); receptores de hormonas o factores de crecimiento; una integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neutrófico tal como factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF),

neurotrofina-3, -4, -5, ó -6 (NT-3, NT-4, NT-5, ó NT-6), o un factor de crecimiento neuronal tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblasto tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformador (TGF) tal como TGF- α y TGF- β , incluidos TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, ó TGF- β 5; factor-I y -II de crecimiento insulinoide (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I del cerebro); proteínas de unión de factor insulinoide; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO); factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética de hueso (BMP); un interferón tal como interferón- α , - β , y - γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), *por ej.*, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (ILs), *por ej.*, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de la membrana superficial; factor acelerante de degradación (DAF); un antígeno vírico tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas de transporte; receptores de direccionamiento ("**homing receptors**"); adresinas; proteínas reguladoras; inmunoadhesinas; anticuerpos; y fragmentos biológicamente activos o variantes de cualquiera de los polipéptidos ya enumerados.

De preferencia, la proteína que se formula es esencialmente pura y esencialmente homogénea (*es decir*, libre de proteínas contaminantes). Proteína "esencialmente pura" significa una composición que comprende por lo menos alrededor de 90% en peso de la proteína, basado en el peso total de la composición, preferiblemente por lo menos alrededor de 95% en peso. Proteína "esencialmente homogénea" significa una composición que comprende por lo menos alrededor de 99% en peso de proteína, basado en el peso total de la composición.

En ciertas incorporaciones, la proteína es un anticuerpo. El anticuerpo puede unirse a cualquiera de las moléculas ya mencionadas, por ejemplo. Dianas moleculares ejemplares de anticuerpos comprendidos por la presente invención incluyen IgE, las proteínas CD CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 y CD40; miembros de la familia de receptor HER tal como receptor

EGF, receptor HER2, HER3 ó HER4; 2c4,4D5, PSCA, LDP-2, moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina $\alpha v/\beta 3$ incluidas las subunidades α - y β - de la misma (por ej., anticuerpos anti-CD11a, anti-CD 18 ó anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*, CTLA-4, y proteína C.

El término "anticuerpo", tal como se emplea aquí, incluye anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos de longitud total que poseen una región de inmunoglobulina Fc), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (*por ej.*, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos ("*diabodies*"), y moléculas de cadena única, así como fragmentos de anticuerpo (*por ej.*, Fab, F(ab')₂, y Fv). El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa aquí indistintamente con "anticuerpo".

El anticuerpo de cadena básica 4 es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadena ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste de 5 de la unidad de heterotetrámero básica junto con un polipéptido adicional llamado una cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden de 2-5 de las unidades de cadena 4 básica, que pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de IgGs, la unidad de cadena 4 es generalmente alrededor de 150.000 daltons. Cada cadena L se enlaza a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se enlazan entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L posee igualmente puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena H tiene en el término N, un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el término N, un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios

variables de cadena ligera y cadena pesada. El apareamiento de un V_H y V_L juntos forma un sitio único de unión a antígeno. Con respecto a la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase *por ej.*, *Basic and Clinical Immunology*, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie vertebrada puede asignarse a uno o dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, que poseen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y μ se dividen aún más en subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y función CH, *por ej.*, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre anticuerpos. El dominio V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a través de toda la extensión de los dominios variables. En lugar de ello, las regiones V consisten de tramos relativamente invariables llamados regiones marco ("*framework regions*") (FRs) de alrededor de 15-30 residuos de aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad llamadas "regiones hipervariables" o, a veces, "regiones determinantes de complementaridad" (CDRs) que son cada una aproximadamente 9-12 residuos de aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas nativas pesadas y ligeras comprenden cada una cuatro FRs, adoptando en gran medida una configuración de hoja β (" *β -sheet configuration*"), conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de la hoja β . Las regiones

hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FRs y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de anticuerpos (véase Kabat y colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los dominios constantes no están implicados directamente en fijar un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tales como participación de la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

El término "región hipervariable" (también conocida como "regiones determinantes de complementaridad" o CDRs), cuando se emplean aquí, se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo, que son (usualmente tres o cuatro regiones cortas de extrema variabilidad de secuencia) en el dominio de la región V de una inmunoglobulina, que forman el sitio de unión al antígeno y son los principales determinantes de la especificidad del antígeno. Existen por lo menos dos métodos para identificar los residuos CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia de especie cruzada (*es decir*, Kabat y colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, MS 1991); y (2) Un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia, C. y colaboradores, *J. Mol Biol* 196: 901-917 (1987)). No obstante, en la medida en que dos técnicas de identificación de residuos definen regiones de regiones traslapantes, mas no idénticas, pueden combinarse para definir una CDR híbrida.

El término "anticuerpo monoclonal", tal como se emplea aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, salvo por posibles mutaciones que ocurren naturalmente y/o modificaciones pos-traducción (*por ej.*, isomerizaciones, amidaciones) que puedan estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Más aún, en contraste con preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales, las cuales

134

incluyen por lo general diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único sobre el antígeno. Aparte de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que son sintetizados por el cultivo de hibridomas, incontaminados por otras inmunoglobulinas. El atributo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no tiene que interpretarse como requiriendo producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usarse de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y colaboradores, *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden elaborarse por métodos de ADN recombinante (véase, *por ej.*, Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse asimismo de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en Clackson y colaboradores, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales mencionados aquí incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas), en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular, o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto(s) de la cadena es(son) idéntico(s) con u homólogos a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison y colaboradores, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés indicados aquí incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias fijadoras de antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (*por ej.*, simio del viejo mundo, mono, *etc.*) y secuencias de región constante humana.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un CL y por lo menos los dominios de cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (*por ej.*, dominios de subsecuencia nativa humana) o sus variantes de secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable y/o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase Patente de los Estados Unidos 5,641,870, Ejemplo 2; Zapata y colaboradores, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produjo dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consta de toda una cadena L junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión de antígeno, *es decir*, posee un sitio de unión único. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo proporciona un fragmento único grande $F(ab')_2$, que aproximadamente corresponde a dos fragmentos Fab enlazados a disulfuro, que tienen diferente actividad de unión a antígeno y que están aún en capacidad de entrecruzar el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos cuantos residuos adicionales en el término carboxi del dominio C_{H1} que incluye una o más cisteínas de la región de unión flexible del anticuerpo. Fab'-SH es la designación utilizada aquí para Fab', en la cual el residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpo se produjeron originalmente como parejas de fragmentos Fab', que poseen cisteínas de unión flexible ("*hinge cysteines*") entre ellos. Se conocen igualmente otros

acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las porciones terminales carboxi de las dos cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectores de anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, región que se reconoce también por receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo, que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Este fragmento consta de un dímero de un dominio de región variable de una cadena pesada y una ligera en asociación estrecha, no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L), que aportan los residuos de aminoácidos para la unión del antígeno y confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. No obstante, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres CDRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y fijar antígeno, si bien con una afinidad más baja que todo el sitio de unión.

"Fv de cadena única" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados a una sola cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un enlazante de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para unión de antígeno. Para una reseña del sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, páginas 269-315(1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con residuos (alrededor de 5-10) enlazantes cortos) entre los dominios V_H y V_L, de manera que se logre emparejamiento entre cadena, mas no intra cadena, de los dominios V, resultando así en un fragmento bivalente, *es decir*, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Diacuerpos biespecíficos y heterodímeros de dos fragmentos sFv "genotipo resultante del

137
cruce" ("**crossover**") en los cuales los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Los diacuerpos se describen con gran detalle en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

Un anticuerpo que "específicamente se fija a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular que se fija a ese polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular, sin fijarse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

El término "fase sólida" describe una matriz no acuosa a la cual puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fase sólidas comprendidas aquí incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (*por ej.*, vidrio de poro controlado), polisacáridos (*por ej.*, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas incorporaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (*por ej.*, una columna de cromatografía de afinidad). Este término incluye asimismo una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 4,275,149.

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ej.*, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas o fragmentos de inmunoglobulina (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) de la mayoría de secuencias humanas, que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales residuos de una región hipervariable (o sea, CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tienen las especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Más aún, "anticuerpos humanizados", tal como se emplea

aquí, pueden comprender asimismo residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen además para refinar y optimizar el rendimiento del anticuerpo. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para mayores detalles, véase Jones y colaboradores, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann y colaboradores, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol*, 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo dependiente de la especie", *por ej.*, un anticuerpo IgE anti-humano mamífero, es un anticuerpo que posee una afinidad de unión más fuerte para un antígeno de una primera especie mamífera que la que tiene para un homólogo de ese antígeno de una segunda especie mamífera. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie "se fija específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de alrededor de 1×10^{-7} M, alternativamente no más de alrededor de 1×10^{-8} M, alternativamente no más de alrededor de 1×10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión para un homólogo del antígeno de una segunda especie mamífera no humana, que es por lo menos alrededor de 50 veces, por lo menos alrededor de 500 veces, o por lo menos alrededor de 1000 veces, más débil que su afinidad de unión para el antígeno no humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los varios tipos de anticuerpos como se define más arriba, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variable de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: citotoxicidad dependiente de unión y complemento C1q; unión de receptor Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (*por ej.*, receptores de célula B); y activación de célula

B.

"Citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad, en la cual Ig segregada ligada a receptores Fc (FcRs) presente en ciertas células citotóxicas (*por ej.*, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se fijen específicamente a una célula diana portadora de un antígeno y, subsiguientemente eliminan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y se requieren para la eliminación de la célula diana por este mecanismo. Las células primarias para mediar ADCC, linfocitos citolíticos naturales, expresar FcγRIII únicamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de Fc en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3, página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede llevarse a cabo un análisis ACDD *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de los estados Unidos No. 5,500,362 ó 5,821,337. Células efectoras útiles para tales análisis incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, *por ej.*, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes y colaboradores, *PNAS USA* 95:652-656 (1998).

"Receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se fija a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Más aún, un FcR preferido es uno que fija un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluidas variantes alélicas y, alternativamente, formas empalmadas de estos receptores. Receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), con secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación a base de tirosina de inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición a base de tirosina de

inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico, (véase M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). Los FcRs se reseñan en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel y colaboradores, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas y colaboradores, *J. Lab. Clin. Med* 126: 330-41 (1995). Otros FcRs, incluidos aquellos por identificar en el futuro, se abarcan por el término "FcR" contenido aquí. El término comprende asimismo el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto. Guyer y colaboradores, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim y colaboradores, *J. Immunol* 24: 249 (1994).

"Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan una o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos, que median ADCC, incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos, prefiriéndose PBMC y linfocitos citolíticos naturales maduros (MNK). Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, *por ej.*, sangre.

"Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en la presencia de complemento. La activación de la ruta de complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen a su antígeno afín. Para evaluar la activación de complemento, puede realizarse un análisis CDC, *por ej.*, como se describe en Gazzano-Santoro y colaboradores, *J. Immunol Methods* 202: 163 (1996).

"Aislado" cuando se usa para describir los varios polipéptidos y anticuerpos divulgados aquí, significa un polipéptido o anticuerpo que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción. Preferiblemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción. Componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como los resultantes de células transfectadas recombinantes, son materiales que interferirían por lo general los usos diagnósticos o terapéuticos para el

polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En incorporaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) a un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos N-terminales o secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria ("*spinning cup sequenator*"), o (2) a una homogeneidad mediante SDS-PAGB bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul Coomassie o, preferiblemente, tintura de plata. De ordinario, sin embargo, un polipéptido o anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos un paso de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislado" que codifica los polipéptidos y anticuerpos mencionados aquí es una molécula de ácido nucleico, que se identifica y separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico de contaminante, con el que se asocia ordinariamente en el entorno en el cual se produjo. Preferiblemente, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. Las moléculas de ácido nucleico aislado que codifican los polipéptidos y anticuerpos mencionados aquí están en una forma distinta de la forma o escenario en que se encuentran en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aislado se distinguen, por consiguiente, del ácido nucleico que codifica los polipéptidos y anticuerpos mencionados aquí existentes naturalmente en las células.

El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora operacionalmente enlazada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son apropiadas para procariotas, por ejemplo, incluyen una secuencia promotora, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión de ribosoma. Las células eucarióticas son conocidas por utilizar promotores, señales de poliadenilación, e intensificadores del fenotipo de los genes ("*enhancers*").

El ácido nucleico está "operacionalmente enlazado" cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una pre-secuencia o líder secretor está operacionalmente enlazado

al ADN para un polipéptido, si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador del fenotipo de los genes está operacionalmente enlazada a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de ribosoma está operacionalmente enlazado a una secuencia codificadora si está situado de manera que facilite la traducción. Por lo general, "operacionalmente enlazado" significa que las secuencias de ADN que se están enlazando son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en la fase de lectura. No obstante, los intensificadores del fenotipo de los genes no tienen que ser contiguos. El enlazamiento se efectúa mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o enlazantes se usan de acuerdo con la práctica convencional.

El término "etiquetado con epítipo", cuando se emplea aquí, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido o anticuerpo, descrito aquí, fusionado a un "polipéptido de etiqueta". El polipéptido de etiqueta tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el cual puede hacerse un anticuerpo, pero que es suficientemente corto de modo que no interfiera la actividad del polipéptido al cual se fusiona. Por lo tanto, de preferencia, el polipéptido de etiqueta es moderadamente único, de modo que el anticuerpo sustancialmente no reacciona en forma cruzada con otros epítipos. Por lo general, polipéptidos de etiqueta adecuados poseen por lo menos seis residuos de aminoácidos y, habitualmente, entre alrededor de 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre alrededor de 10 y 20 residuos de aminoácidos).

Tal como se emplea aquí, el término "inmunoadhesina" designa moléculas pseudo-anticuerpo ("*antibody-like molecules*"), que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada, que es distinta del sitio de reconocimiento y unión al antígeno del anticuerpo (es

decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contigua, que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como IgG-1, IgG-2, IgG-3, o subtipos de IgG-4, IgA (incluidas IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD ó IgM. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la substitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito aquí en lugar de por lo menos una región variable en una molécula de Ig. En una incorporación particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones de unión flexible, CH2 y CH3, o las regiones de unión flexible, CH1, CH2 y CH3 de una molécula IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también la Patente de los Estados Unidos No. 5,428,130, publicada en junio 27 de 1995.

Una formulación "estable" es una en la cual la proteína contenida allí retiene esencialmente su estabilidad e integridad física y química por el almacenamiento. En el arte se dispone de varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de la proteína y se reseñan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). La estabilidad puede medirse con una temperatura seleccionada por un período de tiempo seleccionado. Para un cribado rápido, la formulación puede mantenerse a 40°C por 2 semanas a 1 mes, tiempo en el cual se mide la estabilidad en el tiempo. Donde la formulación tiene que almacenarse a 2-8°C, por lo general la formulación debe ser estable a 30°C o 40°C por lo menos 1 mes y/o estable a 2-8°C por lo menos 2 años. Donde la formulación tiene que almacenarse a 30°C, por lo general la formulación debe ser estable por lo menos 2 años a 30°C y/o estable a 40°C por lo menos 6 meses. Por ejemplo, el volumen de agregación por el almacenamiento puede usarse como un indicador de la estabilidad de la proteína. Por consiguiente, una formulación "estable" puede ser una en donde menos de alrededor de 10% y, preferiblemente, menos de alrededor de 5% de la proteína están presentes

como un agregado en la formulación. En otras incorporaciones, puede determinarse cualquier aumento en la formación de agregados por el almacenamiento de la formulación.

Una formulación "reconstituida" es una que se ha preparado disolviendo una formulación de anticuerpo o proteína liofilizada en un diluyente, de modo que la proteína se disperse en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es apropiada para administración (por ej., administración parenteral) a un paciente que se va a tratar con la proteína de interés y, en ciertas incorporaciones de la invención, puede ser una que es apta para administración subcutánea.

Una formulación "isotónica" es una que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica de alrededor de 250 a 350 mOsm. El término "hipotónica" describe una formulación con una presión osmótica por debajo de la de la sangre humana. Correspondientemente, el término "hipertónica" se utiliza para describir una formulación con una presión osmótica por encima de la de la sangre humana. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro tipo vapor de agua o congelamiento con hielo, por ejemplo. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o tampón.

Un "ácido farmacéuticamente aceptable" incluye ácidos orgánicos e inorgánicos que son no tóxicos en la concentración y manera en que se formulan. Por ejemplo, ácidos inorgánicos apropiados incluyen clorhídrico, perclórico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, *etc.* Ácidos orgánicos adecuados incluyen alquilo de cadena recta y ramificada, aromático, cíclico, cicloalifático, arilalifático, heterocíclico, saturado, insaturado, mono, di- y tri-carboxílico, incluido por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, *t*-butil acético, antranílico, propanoico, 2-hidroxiopropanoico, 2-oxopropanoico, propanodioico, ciclopentanopropiónico, ciclopentanopropiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butanodioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico,

2-acetoxi-benzoico, ascórbico, cinnámico, lauril sulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glicónico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmoico, palmeico, tiociánico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroixetanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, *p*-toluenosulfónico, alcanforsulfónico, 4-metilbiciclo[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, glucoheptónico, 4,4'-metilenbis-3-(hidrox-2-en-1-carboxílico), hidroxinaftoico.

"Bases farmacéuticamente aceptables" incluyen bases orgánicas e inorgánicas y que son no tóxicas en la concentración y manera en la que se formulan. Por ejemplo, bases apropiadas incluyen las formadas de metales que forman una base inorgánica tales como litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfolina, piperidina y bases atóxicas orgánicas incluidas, amina primaria, secundaria y terciaria, aminas sustituidas, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio de iones, [*por ej.*, $N(R')_4^+$ (donde R' es independientemente H o C₁₋₄ alquilo, *por ej.*, amonio Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Bases atóxicas orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, dicitclohexilamina, colina, y cafeína.

Ácidos y bases adicionales farmacéuticamente aceptables, útiles con la presente invención incluyen los que se derivan de aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.

Tampones y sales "farmacéuticamente aceptables" incluyen los derivados de sales de adición de ácido y base de los ácidos y bases ya

indicados. Los tampones o sales específicos incluyen histidina, succinato y acetato.

Un "lioprotector" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad física y/o química de la proteína al momento de la liofilización y almacenamiento subsiguiente. Lioprotectores ejemplares incluyen azúcares y sus correspondientes alcoholes de azúcar; un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcar trihídricos o de peso molecular más alto, *por ej.*, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; propilen glicol; polietilen glicol; Pluronic[®]; y combinaciones de los mismos. Los lioprotectores ejemplares adicionales incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melezitosa, rafinosa, mannotriosa y estaquiosa. Ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Ejemplos azúcares no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos polihidroxi seleccionados de alcoholes de azúcar y otros polialcoholes de cadena recta. Alcoholes de azúcar preferidos son monoglucósidos, especialmente aquellos compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glicosídico puede ser glucosídico o galactosídico. Ejemplos adicionales de alcoholes de azúcar son glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulosa. El lioprotector preferido son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa.

El lioprotector se añade a la formulación pre-liofilizada en una "cantidad lioprotectora", lo cual significa que, luego de la liofilización de la proteína en la presencia de una cantidad lioprotectora del lioprotector, la proteína retiene esencialmente su estabilidad e integridad física y química al momento de la liofilización y el almacenamiento.

En la preparación de las formulaciones de viscosidad reducida de la invención, hay que tener cuidado al usar los excipientes ya enumerados, así como otros aditivos, especialmente cuando se agregan con alta

concentración, con el fin de no aumentar la viscosidad de la formulación.

Un "azúcar farmacéuticamente aceptable" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, evita o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína al almacenamiento. Cuando la formulación está destinada a liofilizarse y luego a reconstituirse, "azúcares farmacéuticamente aceptables" pueden conocerse asimismo como un "lioprotector". Azúcares ejemplares y sus alcoholes de azúcar correspondientes incluyen: un aminoácido tal como glutamato de sodio o histidina; una metilamina tal como betaína; un sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcar trihídricos o de peso molecular más alto, *por ej.*, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; propilen glicol; polietilen glicol; Pluronic®; y sus combinaciones. Lioprotectores ejemplares adicionales incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Ejemplos de azúcares no reductores incluyen glicósidos no reductores de compuestos polihidroxi seleccionados de alcoholes de azúcar y demás polialcoholes de cadena recta. Alcoholes de azúcar preferidos son monoglucósidos, especialmente los compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glicosídico puede ser glucosídico o galactosídico. Ejemplos adicionales de alcoholes de azúcar son glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulosa. Los azúcares preferidos farmacéuticamente aceptables son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa.

Azúcares farmacéuticamente aceptables se añaden a la formulación en una "cantidad protectora" (*por ej.*, pre-liofilización) que significa que la proteína retiene esencialmente su estabilidad física y química e integridad por el almacenamiento (*por ej.*, después de la reconstitución y almacenamiento).

El "diluyente" de interés especificado aquí es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y atóxico para administración a un

humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida luego de la liofilización. Diluyentes ejemplares incluyen agua esterilizada, agua bacteriostática para inyección (BWFI), y una solución tamponada en su pH (*por ej.*, salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de cloruro sódico compuesto ("**Ringers' solution**") o solución de dextrosa. En una incorporación alternativa, los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

Un "preservante" es un compuesto que puede agregarse a las formulaciones especificadas aquí para reducir una actividad bacteriana. La adición de un preservante, por ejemplo, puede facilitar la producción de una formulación multi-uso (dosis múltiple). Ejemplos de preservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio, en los cuales los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de preservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y *m*-cresol. Aquí, el preservante más preferido aquí es alcohol bencílico.

"Tratamiento" se refiere a tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas con preventivos. Los pacientes necesitados de tratamiento incluyen aquellos que ya padecen del trastorno, así como aquellos en los cual el trastorno tiene que prevenirse.

"Mamífero" para efectos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de competición, o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, ganado, cerdos, hámsters, jerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, *etc.* El mamífero es preferiblemente humano.

Un "trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con la proteína. Éste incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades, incluidos aquellos estados patológicos que predisponen el

mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos por tratarse aquí incluyen carcinomas y alergias.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es por lo menos la concentración mínima requerida para producir una mejora cuantificable o prevención de un trastorno particular. Cantidades terapéuticamente efectivas de proteínas conocidas son bien conocidas en el arte, mientras que las cantidades efectivas de proteínas descubiertas a partir de ahora pueden determinarse por técnicas estándar, que están bien dentro de las habilidades de un artesano experto, tal como un médico normal.

"Viscosidad" tal como se emplea aquí puede ser "viscosidad cinemática" o "viscosidad absoluta". "Viscosidad cinemática" es una medida del flujo resistente de un fluido bajo la influencia de la gravedad. Cuando dos fluidos de igual volumen se ponen en viscómetros capilares idénticos y se dejan fluir por gravedad, un fluido viscoso toma más tiempo que un fluido menos viscoso en fluir a través del capilar. Si un fluido toma 200 segundos para completar su flujo y otro fluido toma 400 segundos, el segundo fluido es dos veces tan viscoso como el primero en una escala de viscosidad cinemática. "Viscosidad absoluta", llamada algunas veces viscosidad dinámica o simple, es el producto de la viscosidad cinemática y la densidad del fluido:

$$\text{Viscosidad Absoluta} = \text{Viscosidad Cinemática} \times \text{Densidad}$$

La dimensión de la viscosidad cinemática es L^2/T donde L es una longitud y T es un tiempo. Comúnmente, la viscosidad cinemática se expresa en centistokes (cSt). La unidad SI de viscosidad cinemática es mm^2/s , que es 1 cSt. La viscosidad absoluta se expresa en unidades de centipoise (cP). La unidad SI de la viscosidad absoluta es el miliPascal-segundo (mPa-s), donde $1 \text{ cP} = 1 \text{ mPa-s}$.

Una "antihistamina" tal como se emplea aquí es un agente que antagoniza el efecto fisiológico de la histamina. La unión de la histamina a sus receptores, H_1 y H_2 resulta en los síntomas alérgicos característicos y los efectos de picazón, eritema, hinchazón, *etc.* Muchas antihistaminas actúan bloqueando la unión de histamina a sus receptores, H_1 , H_2 ; no obstante, se

cree que otros operan inhibiendo la liberación de histamina. Ejemplos de antihistaminas son clorfeniramina, difenhidramina, prometazina, cromolina sódica, astemizol, maleato de azatadina, maleato de brofeniramina, maleato de carbinoxamina, lorhidrato de cetirizina, fumarato de clemastina, clorhidrato de ciproheptadina, maleato de dexbromfeniramina, maleato de dexclorfeniramina, dimenhidrinato, clorhidrato de difenhidramina, succinato de doxilamina, clorhidrato de fexofendadina, clorhidrato de terfenadina, clorhidrato de hidroxizina, loratidina, clorhidrato de meclizina, citrato de tripelannamina, clorhidrato de tripeleennamina, clorhidrato de triprolidina.

Un "broncodilatador" tal como se emplea aquí, describe un agente que antagoniza o reversa la broncoconstricción, un acontecimiento fisiológico que ocurre típicamente en reacciones asmáticas de fase temprana que resultan en una menor capacidad pulmonar y falta de respiración. Broncodilatadores ejemplares incluyen epinerina, un beta y alfa adrenérgico de amplio espectro, y los beta-adrenérgicos albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol, y isoetarina. La broncodilatación puede lograrse también mediante la administración de xantinas, incluidas aminofilina y teofilina.

Un "glucocorticoide" tal como se emplea aquí describe agentes a base de esteroides con actividad antiinflamatoria. Los glucocorticoides se emplean comúnmente para atenuar la reacción asmática de fase tardía. Glucocorticoides ejemplares incluyen, prednisona, dipropionato de beclometasona, acetónido de triamcinolona, flunisolida, betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de fludrocortisona, flunisolida, propionato de fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona.

Un "medicamento antiinflamatorio no esteroide" o "AINE", tal como se emplea aquí describe agentes con actividad antiinflamatoria que no son a base de esteroides. AINE ejemplares incluyen acetaminofén, aspirina, bromfenac sódico, diclofenac sódico, diflunisal, etodolac, fenoprofeno cálcico, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, meclofenamato sódico, ácido mefenámico, nabumetona, naproxeno,

naproxeno sódico, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina sódica.

II. Modos para Llevar a Cabo la Invención

A. Preparación de Anticuerpo y Polipéptido

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de los polipéptidos o anticuerpos descritos aquí cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifican los mismos y la purificación de la proteína o anticuerpo resultante. Naturalmente, se contempla que puedan emplearse métodos alternativos, que son bien conocidos en el arte, para preparar tales polipéptidos o anticuerpos. Por ejemplo, tales secuencias, o porciones de las mismas, pueden producirse mediante síntesis directa de péptidos usando técnicas de fase sólida [véase, por ej., Stewart y colaboradores, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)]. Puede realizarse síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) empleando las instrucciones del fabricante. Varias porciones de las proteínas o anticuerpos descritos aquí pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse utilizando métodos químicos o enzimáticos.

1. Aislamiento de ADN que codifica las proteínas descritas aquí

ADN que codifica las proteínas descritas aquí puede obtenerse de una biblioteca cADN preparada de tejido que se cree que posee el mRNA correspondiente y que lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, tal ADN codificador de proteína humana puede obtenerse convenientemente de una biblioteca cADN preparada de tejido humano, tal como describe en los Ejemplos. El gen codificador de proteína puede obtenerse igualmente de una biblioteca genómico o por procedimientos sintéticos conocidos (*por ej.*,

síntesis automatizada de ácido nucleico).

Las bibliotecas pueden cribarse con sondas (tales como oligonucleótidos de por lo menos alrededor de 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés. El cribado del cADN o biblioteca genómica con la sonda seleccionada puede conducirse usando procedimientos estándar, tales como los descritos en Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el gen deseado es usar metodología PCR [Sambrook y colaboradores, más arriba; Dieffenbach y colaboradores, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una biblioteca cADN. La secuencia de oligonucleótidos seleccionados como sondas debe ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca que se minimicen positivos falsos. El oligonucleótido se etiqueta preferiblemente de modo que pueda detectarse con la hibridación a ADN en la biblioteca que se está cribando. Métodos de etiquetado son bien conocidos en el arte, e incluyen el uso de radiomarcadores como ATP marcado con ^{32}P , biotinilación o marcación con enzimas. Las condiciones de hibridación, incluidas la estringencia moderada y la estringencia alta, se proveen en Sambrook y colaboradores, más arriba.

Las secuencias identificadas en tales métodos de tamizado de bibliotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas en bases de datos públicas tales como Genbank u otras bases de datos privadas de secuencias. La identidad de la secuencia (a nivel de aminoácidos o nucleótidos) en regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud total puede determinarse usando métodos conocidos en el arte, como se describe aquí.

Ácido nucleico con una secuencia codificadora de proteína puede obtenerse cribando CADN seleccionado o bibliotecas genómicas usando la secuencia deducida de aminoácidos divulgada aquí por primera vez, y, si es necesario, usando procedimientos convencionales de ampliación de cebador

como se describe en Sambrook y colaboradores, más arriba, para detectar precursores e intermedios de procesamiento de mARN que pueden no haberse transcrito en forma reversa en cADN.

2. Selección y Transformación de Células Huéspedes

Células huéspedes se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación que contienen las proteínas o anticuerpos descritos aquí para la producción y cultivadas en medios nutrientes convencionales modificados, según lo apropiado, para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medios, temperatura, pH y similares, pueden seleccionarse por el artesano experto sin experimentación excesiva. En general, principios, protocolos, y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos de células pueden hallarse en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y colaboradores, más arriba.

Métodos de transfección de células eucarióticas y transformación de células procarióticas son conocidos por el artesano de habilidad ordinaria, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediada por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se lleva a cabo usando técnicas estándar apropiadas a tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio, como se describe en Sambrook y colaboradores, más arriba, o electroporación se utiliza generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales, como se describe por Shaw y colaboradores, *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para células mamíferas sin tales paredes celulares, puede emplearse el método de precipitación de fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Aspectos generales de transfecciones del sistema huésped de células mamíferas se han descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 4,399,216. Las transformaciones en levadura se llevan típicamente a cabo de acuerdo con el método de Van Solingen y

colaboradores, J. Bad., 130:946 (1977) y Hsiao y colaboradores, Proc. Natl Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). No obstante, también pueden usarse otros métodos para introducir ADN en las células, tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policationes, por ej., polibreno, poliornitina. Para varias técnicas de transformar células mamíferas, véase Keown y colaboradores, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour y colaboradores, *Nature*, 336:348-352 (1988).

Células huéspedes apropiadas para clonar o expresar el ADN en los vectores especificados aquí incluyen células procariotas, levadura, o células eucariotas más altas. Procariotas adecuadas incluyen pero no se limitan a eubacterias, tales como organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* se encuentran públicamente disponibles, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); la cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53,635). Otras células huéspedes procarióticas apropiadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ej., *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilli tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ej., *B. licheniformis* 41P divulgado en DD 266,710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos, y no limitantes. La cepa W3110 es un huésped particularmente preferido o huésped progenitor porque es una cepa huésped común para fermentaciones de producto ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, incluyendo los ejemplos de tales anfitriones la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55,244), que tiene el genotipo completo *tonA*

ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan'; la cepa de *E. coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan'*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de eliminación *degP* no resistente a la canamicina; y una cepa de *E. coli* con proteasa periplásmica mutante divulgada en la Patente de los Estados Unidos No. 4,946,783 publicada el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados métodos *in vitro* de clonación, *por ej.*, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

Además de las procariotas, microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o levadura son anfitriones apropiados de clonación o expresión para vectores que codifican las proteínas o anticuerpos descritos aquí. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior comúnmente utilizado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290:140 [1981]; EP 139,383 publicada el 2 de mayo de 1985); anfitriones *Kluyveromyces* (Patente de los Estados Unidos No. 4,943,529; Fleer y colaboradores, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) tal como, *por ej.*, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y colaboradores, *J. Bacteriol*, 154(2): 737-42 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906; Van den Berg y colaboradores, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna y colaboradores, *J. Basic Microbiol*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, *por ej.*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y anfitriones *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y colaboradores, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn y colaboradores, *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y

Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Levaduras metilotrópicas son adecuadas aquí e incluyen, mas no se limitan a, levadura susceptible de crecimiento en metanol, seleccionada de los géneros conformados por *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Un listado de especies específicas que son ejemplares de esta clase de levaduras puede hallarse en C. Anthony, *The Biochemistry of Metilotrophs*, 269 (1982).

Células huéspedes apropiadas para la expresión de forma glucosilada de los polipéptidos y anticuerpos descritos aquí se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Ejemplos de líneas celulares huéspedes mamíferas útiles incluyen células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 ó 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham y colaboradores, *J. Gen Virol*, 36:59 (1977)); células derivadas de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol Reprod*, 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Se considera que la selección de la célula huésped apropiada se encuentra dentro de las habilidades conocidas en el arte.

3. Selección y Uso de un Vector Replicable

El ácido nucleico (*por ej.*, cADN o ADN genómico), que codifica los polipéptidos y anticuerpos descritos aquí, puede insertarse en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Varios vectores se encuentran disponibles públicamente. El vector puede, por ejemplo, estar en la forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica, o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiado puede insertarse en el vector por

una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio(s) de endonucleasa de restricción apropiado usando técnicas conocidas en el arte. Los componentes del vector incluyen por lo general, mas no se limitan a, una o más de una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador del fenotipo de los genes, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción. La construcción de vectores que contengan uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación estándar, que son conocidas por el artesano experto.

La producción recombinante de los polipéptidos o anticuerpos puede realizarse no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo. La porción heteróloga puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido con un sitio específico de segmentación en el N-término de la proteína madura o polipéptido. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido o anticuerpo que se inserta en el vector. La secuencia de señal una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, enterotoxina II estable al calor. Para secreción de levadura la secuencia de señal puede ser, por ej., el líder de invertasa de levadura, el líder de factor alfa (incluidos los líderes de factor α *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, éste último descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,010,182), o el líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa *C. albicans* (EP 362,179 publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en WO 90/13646 publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células mamíferas, las secuencias de señal mamíferas pueden usarse para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias de señal de polipéptidos segregados de la misma especie o especie relacionada, así como líderes secretores víricos.

Los vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huéspedes seleccionadas. Tales secuencias son bien conocidas de una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es apropiado para la mayoría de bacterias gram-negativas,

el origen de replicación del plásmido 2 μ es apropiado para levadura, y varios orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células mamíferas.

Los vectores de expresión y clonación contendrán por lo general un gen de selección, denominado igualmente un marcador seleccionable. Genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, *por ej.*, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, *por ej.*, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de marcadores seleccionables apropiados para células mamíferas son los que permiten la identificación de células competentes absorber la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos o anticuerpos descritos aquí, tales como DHFR (dihidrofolato reductasa) o timidina cinasa. Una célula huésped apropiada, cuando se emplea DHFR de tipo natural es la línea celular CHO deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Un gen de selección apropiado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb y colaboradores, *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman y colaboradores, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper y colaboradores, *Gene*, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 ó PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Los vectores de expresión y clonación contienen usualmente un promotor enlazado operacionalmente a tales secuencias de ADN para dirigir la síntesis de mRNA. Promotores reconocidos por una variedad de células huéspedes potenciales son bien conocidos. Promotores adecuados para uso con anfitriones procarióticos incluyen los sistemas promotores β -lactamasa y lactosa [Chang y colaboradores, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel y colaboradores, *Nature*, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor triptófano (*trp*) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP

36,776], y promotores híbridos tales como el promotor tac [deBoer y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promotores para uso en sistemas bacterianos contendrán asimismo una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) operacionalmente enlazada a tales secuencias de ADN.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con anfitriones de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa [Hitzeman y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess y colaboradores, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, hexocinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucocinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles con la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol dehidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen además en EP 73,657.

La transcripción de vectores en células huéspedes mamíferas puede controlarse, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus como el virus polioma, el virus de la viruela aviar (UK 2,211,504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y el virus de los simios 40 (SV40), de promotores heterólogos mamíferos, *por ej.*, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, a condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huéspedes.

La transcripción de ácido nucleico que codifica los polipéptidos o anticuerpos mencionados aquí por eucariotas más altas pueden incrementarse insertando una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos cis-actantes de ADN, usualmente alrededor de desde 10 a 300 bp, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Muchas secuencias intensificadoras son ahora conocidas de genes mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Típicamente, sin embargo, uno utilizaría un intensificador de un virus de célula eucariótica. Ejemplos incluyen el intensificador SV40 en el último lado del origen de replicación (bp 100-270), el intensificador de promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, e intensificadores de adenovirus. El intensificador puede empalmarse en el vector en una posición 5' ó 3' a la secuencia codificadora, pero se localiza preferiblemente en el sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células huéspedes eucarióticas (células de levadura, hongos, insectos, vegetales, animales, humanas, o nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán igualmente secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el mRNA. Tales secuencias son comúnmente disponibles de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADNs eucarióticos o víricos o cADNs. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mRNA que codifica los polipéptidos o anticuerpos descritos aquí.

Todavía otros métodos, vectores, y células huéspedes apropiadas para adaptación a la síntesis de los polipéptidos o anticuerpos descritos aquí en cultivo de célula de vertebrado recombinante se describen en Gething y colaboradores, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei y colaboradores, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060; y EP 117,058.

4. Amplificación/Expresión de Genes Detectores

La amplificación y/o expresión de genes puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia de proteínas

convencional de Southern ("***Southern blotting***"), transferencia de proteínas de Northern para cuantificar la transcripción de mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], el método de transferencia de proteínas ("***dot blotting***") (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda apropiadamente marcada, basada en las secuencias suministradas aquí. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que puedan reconocer dúplexes específicos, incluidos dúplexes de ADN, dúplexes de ARN, y dúplexes híbridos ADN-ARN o dúplexes de proteína-ADN. Los anticuerpos, a su vez, pueden marcarse y el análisis puede llevarse a cabo donde el dúplex se une a la superficie, de modo que a la formación del dúplex en la superficie, no pueda detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

Alternativamente, la expresión de los genes puede medirse por métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y análisis de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o análisis de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra los polipéptidos descritos aquí o contra un péptido sintético, basados en las secuencias de ADN suministradas aquí o contra una secuencia exógena fusionada a ADN que codifique tales polipéptidos y anticuerpos y que codifique un epítipo de anticuerpo específico.

5. Purificación de Polipéptido

Formas de polipéptido pueden recuperarse de medio de cultivo o lisados de células huéspedes. Si unido a la membrana, puede desprenderse de la membrana usando una solución detergente apropiada (*por ej.*, Triton-X 100) o por segmentación enzimática. Las células empleadas en la expresión de los polipéptidos o anticuerpos descritos aquí pueden separarse por varios medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelamiento-descongelamiento, sonicación, separación mecánica, o

agentes lisantes de células.

Puede desearse purificar los polipéptidos o anticuerpos, descritos aquí, de proteínas de células recombinantes u otros polipéptidos. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación apropiados: por fraccionamiento en una columna de intercambio de iones; precipitación en etanol; HPLC de fase reversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio de cationes tal como DEAE; cromatofocado; SDS-PAGE; precipitación en sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefarosa para retirar contaminantes tales como IgG; y columnas de quelado de metales para fijar formas marcadas con epítipo del polipéptido o anticuerpo. Varios métodos de purificación de proteínas pueden emplearse y tales métodos son conocidos en el arte y se describen por ejemplo en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). El paso(s) de purificación seleccionado(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y del polipéptido o anticuerpo particular producido.

B. Preparación de Anticuerpos

En ciertas incorporaciones de la invención, la proteína de elección es un anticuerpo. Siguen a continuación técnicas para la producción de anticuerpos, incluidos anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugado.

1) *Anticuerpos policlonales.*

Los anticuerpos policlonales se producen por lo general en animales por inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que sea inmunógena en la especie a inmunizar, *por ej.*, hemocianina de lapa (KLH), seroalbúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soya, usando un agente bi-funcional o derivatizante, *por ej.*, éster de maleimidobenzoyl sulfosuccinimida (conjugación mediante

residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son independientemente grupos alquilo inferior. Ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (Lípido A de monofosforilo, dicorinomicolato de trehalosa sintética). El protocolo de inmunización puede seleccionarse por un experto en el arte sin experimentación excesiva.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados combinando, *por ej.*, 100 μg ó 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales se revacunaron/reforzaron con 1/5 a 1/10 la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a catorce días después, los animales se sangran y el suero se analiza para establecer la concentración de anticuerpos. Los animales se revacunan hasta que se nivela la concentración. Asimismo pueden elaborarse conjugados en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteína. Además, agentes agregantes tales como sulfato de aluminio son apropiados para intensificar la respuesta inmunitaria.

2) *Anticuerpos monoclonales.*

Anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que ocurran naturalmente y/o modificaciones pos-traducionales (*por ej.*, isomerizaciones, amidaciones) que puedan estar presentes en cantidades menores. Por consiguiente, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como no siendo una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden elaborarse usando el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler y

colaboradores, *Nature*, 256:495 (1975), o puede elaborarse por métodos de ADN recombinante (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza, tal como se describe más arriba en el texto, para provocar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos, que se unirán específicamente a la proteína usada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. En seguida, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente fusionante apropiado, tal como polietilen glicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986).

El agente inmunizante incluirá por lo general la proteína antígeno o una variante de fusión de la misma. Generalmente se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PBLs"), si se desean células de origen humano, o se usan células del vaso o células de nodos linfáticos, si se desean fuentes mamíferas no humanas. Los linfocitos se fusionan entonces con una línea celular inmortalizada usando un agente fusionante apropiado, tal como polietilen glicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103.

Las líneas de célula inmortalizada son usualmente célula mamífera transformada, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Usualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma así preparadas se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma progenitoras no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma progenitoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Células preferidas de mieloma, inmortalizadas, son aquellas que se fusionan eficientemente, favorecen una producción de alto nivel de

anticuerpo por las células seleccionadas productoras de anticuerpos, y son sensibles a un medio tal como HAT. Entre éstas, se prefieren las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 (y sus derivados, por ej., X63-Ag8-653) disponibles de la American Type Culture Collection, Manassus, Virginia USA. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y colaboradores, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual están creciendo las células del hibridoma se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células del hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un análisis de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o enzimoimunoanálisis absorbente (ELISA).

El medio de cultivo, en el cual crecen las células del hibridoma, se puede analizar para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un antígeno deseado. Preferiblemente, la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo monoclonal pueden determinarse por inmunoprecipitación mediante un análisis de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o enzimoanálisis (ELISA). Tales técnicas y análisis son conocidos en el arte. Por ejemplo, la afinidad de unión puede determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson y colaboradores, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Una vez identificadas las células del hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse limitando los procesos de dilución y cultivarse por métodos estándar (Goding, más arriba). Medios apropiados de cultivo para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640.

Adicionalmente, las células del hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se separan convenientemente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita proteína A-sefarosa, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Anticuerpos monoclonales pueden elaborarse igualmente por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567, y como se describen más arriba. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (*por ej.*, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de fijarse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células del hibridoma sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión, los cuales se transfectan luego en células huéspedes tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células derivadas de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma, que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, con el fin de sintetizar anticuerpos monoclonales en tales células huéspedes. Artículos de reseña sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y colaboradores, *Curr. Opinion in Immunol*, 5:256-262 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188(1992).

En una incorporación adicional, los anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos, generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y colaboradores, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y colaboradores, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y colaboradores, *J. Mol Biol*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos humanos y murinos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (margen nM) mediante entremezcla de cadenas

incluidas aquellas que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

3) *Anticuerpos Humanizados.*

Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanos o humanizados. Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (*por ej.*, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de la misma (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias fijadoras de antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor), en las que residuos de una región determinante de complementaridad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por correspondientes residuos no humanos. Anticuerpos humanizados pueden comprender asimismo residuos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias de marco. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno y, típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR correspondan a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá, óptimamente además, por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Jones y colaboradores, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann y colaboradores, *Nature* 332: 323-329 (1988) y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol* 2: 593-596 (1992).

Métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos

en el arte. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", los cuales se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores, Jones y colaboradores, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann y colaboradores, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven y colaboradores, *Science* 239:1534-1536 (1988), o mediante sustitución de secuencias CDRs o CDR de roedor para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos CDR y, posiblemente, algunos residuos FR se sustituyen con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, livianos y pesados, para usarlos en elaborar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado método de "ajuste óptimo", se criba la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor contra toda la biblioteca de secuencias de dominio variable conocidas. La secuencia humana que es más próxima a la del roedor se acepta entonces como el marco (FR) humano para el anticuerpo humanizado. Sims y colaboradores, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987). Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras y pesadas. El mismo marco puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados diferentes. Carter y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y colaboradores, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993).

Es además importante que los anticuerpos se humanicen conservando

una alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para logra este objetivo, de acuerdo con un método preferido, anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias progenitoras y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tri-dimensionales de las secuencias progenitoras y humanizadas. Comúnmente se dispone de modelos tri-dimensionales de inmunoglobulina y son familiares a los expertos en el arte. Se dispone de programas de computador, los cuales ilustran y visualizan estructuras probables de conformación tri-dimensional de secuencias seleccionadas de inmunoglobulina candidata. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, *es decir*, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglulina candidata de fijar su antígeno. De esta forma, pueden seleccionarse residuos FR y combinarse de las secuencias receptoras y de importación, de modo que se logre la característica del anticuerpo deseado, tal como creciente afinidad para el antígeno(s) diana. En general, los residuos CDR se hallan directa y, la mayoría de las veces, sustancialmente implicados en influir en la unión del antígeno.

Se contemplan varias formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo , tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agente(s) citotóxico con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

4) *Anticuerpos Humanos*

Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (*por ej.*, ratones) que son capaces, luego de la inmunización, de producir un completo repertorio de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se

ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada (J_H) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinativa resulta en completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del arreglo de genes de inmunoglobulina de línea germinativa humana en tales ratones mutantes de línea germinativa resultará en la producción de anticuerpos humanos a la exposición al antígeno. Véase, *por ej.*, Jakobovits y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y colaboradores, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann y colaboradores, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); Patentes de los Estados Unidos No. 5,591,669 y WO 97/17852.

Alternativamente, tecnología de visualización de fagos puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. McCafferty y colaboradores, *Nature* 348:552-553 (1990); Hoogenboom y Winter, *J. Mol Biol* 227:381 (1991). De acuerdo con esta técnica, genes de dominio V de anticuerpo se clonan sin cambio en la fase de lectura ("*are cloned in-frame*") en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 ó fd, y se visualizan como fragmentos funcionales de anticuerpo en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de una sola hebra del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo resultan igualmente en la selección del gen codificador del anticuerpo que exhibe estas propiedades. Por consiguiente, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La visualización del fago puede realizarse en una variedad de formatos, reseñados en, *por ej.*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Curr. Opin Struct. Biol.* 3:564-571 (1993). Para la visualización de fagos pueden emplearse varias Fuentes de segmentos de gen V. Clackson y colaboradores, *Nature* 352:624-628 (1991) aislaron un arreglo diverso de anticuerpos de anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes no inmunizados humanos, y

anticuerpos a un arreglo diverso de antígenos (incluidos auto-antígenos) pueden aislarse siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith y colaboradores, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véase también, Patentes de los Estados Unidos No. 5,565,332 y 5,573,905.

Las técnicas de Cole y colaboradores, y Boerner y colaboradores, están igualmente disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y colaboradores, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, página 77 (1985) y Boerner y colaboradores, *J. Immunol.* 147(1): 86-95 (1991). Análogamente, pueden elaborarse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, *por ej.*, ratones en los cuales los genes de la inmunoglobulina endógena se hayan inactivado completa o parcialmente. Con la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemejan estrechamente a los vistos en humanos en todos los aspectos, incluido el re-arreglo de genes, ensamblado y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,545,807; 5,545,806, 5,569,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y colaboradores, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg y colaboradores, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994), Fishwild y colaboradores, *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996), Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Finalmente, anticuerpos humanos pueden generarse igualmente *in vitro* por linfocitos B activados (véase Patentes de los Estados Unidos No. 5,567,610 y 5,229,275).

5) Fragmentos de Anticuerpos

En ciertas circunstancias existen ventajas para usar fragmentos de anticuerpo, en vez de anticuerpos enteros. Tamaños de fragmentos más pequeños permiten una depuración rápida, y pueden llevar a un mejor acceso a tumores sólidos.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, *por ej.*, Morimoto y colaboradores, *J Biochem Biophys. Method.* 24:107-117 (1992); y Brennan y colaboradores, *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células huéspedes recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse en y segregarse de *E. coli*, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y colaboradores, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otra metodología, fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células huéspedes recombinantes. Fab y F(ab')₂ con vida media creciente *in vivo* se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,869,046. En otras incorporaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de los Estados Unidos No. 5,571,894 y Patente de los Estados Unidos No. 5,587,458. El fragmento de anticuerpo puede ser igualmente un "anticuerpo lineal", *por ej.*, como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5,641,870. Tales fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o bi-específicos.

6) *Terapia Mediada por Enzima Dependiente de Anticuerpo (ADEPT)*

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse asimismo en ADEPT conjugando el anticuerpo a una enzima activadora de profármaco, que convierte un profármaco (*por ej.*, un agente quimioterapéutico peptídico, véase WO 81/01145) en un medicamento antineoplásico activo. Véase, *por ejemplo*, WO 88/07378 y Patente de los Estados Unidos No. 4,975,278.

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT

incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma citotóxica, más activa.

Las enzimas que son útiles en el método de esta invención incluyen, pero no se limitan a, glucosidasa, glucosa oxidasa, lisozima humana, glucuronidasa humana, alcalina fosfatasa útil para convertir profármacos que contienen fosfatasa en medicamentos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en medicamentos libres; citosina deaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina atóxica en el medicamento antineoplásico 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratina proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas (*por ej.*, carboxipeptidasa G2 y carboxipeptidasa A) y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en medicamentos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; enzimas de segmentación de carbohidratos tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en medicamentos libres; β -lactamasa útil para convertir medicamentos derivados con β -lactamas en medicamentos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina Vamidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir medicamentos derivados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente en medicamentos libres. Alternativamente, anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en el arte como "abzimas" pueden emplearse para convertir los profármacos de la invención en medicamentos libres activos (véase, *por ej.*, Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describe aquí para entrega de la abisma a una población de células neoplásicas.

Las enzimas mencionadas pueden unirse covalentemente a los polipéptidos o anticuerpos descritos aquí mediante técnicas bien conocidas en el arte, tales como el uso de agentes de entrecruzamiento heterobifuncional, ya discutidos. Alternativamente, proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región fijadora del antígeno del anticuerpo de la invención, enlazada a por lo menos una porción funcionalmente activa de

una enzima de la invención, pueden construirse utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el arte (véase, *por ej.*, Neuberger y colaboradores, *Nature* 312: 604-608 (1984)).

7) *Anticuerpos Biespecíficos y Poliespecíficos*

Anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de unión para por lo menos dos epítopos diferentes, incluidos aquellos en la misma u otra proteína. Alternativamente, un brazo puede armarse para fijarse al antígeno diana, y otro brazo puede combinarse con un brazo que se fije a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula de receptor de leucocito T (*por ej.*, CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16), de modo que se enfoquen y localicen mecanismos de defensa celular a la célula que expresa el antígeno diana. Tales anticuerpos pueden derivarse de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (*por ej.*, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Anticuerpos biespecíficos pueden usarse además para localizar agentes citotóxicos a células que expresan el antígeno diana. Tales anticuerpos poseen un brazo que fija el antígeno deseado, y otro brazo que fija el agente citotóxico (*por ej.*, saporina, anti-interferón-α, vincristina/vinblastina ("*vinca alkaloids*"), cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radioactivo). Ejemplos de anticuerpos biespecíficos conocidos incluyen anti-ErbB2/anti-FcγRIII (WO 96/16673), anti-ErbB2/anti-FcγRI (Patente de los Estados Unidos 5,837,234), anti-ErbB2/anti-CD3 (Patente de los Estados Unidos 5,821,337).

Métodos para elaborar anticuerpos biespecíficos son conocidos en el arte. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos parejas de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes. Millstein y colaboradores, *Nature*, 305:537-539 (1983). Debido a la clasificación aleatoria de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10

diferentes moléculas de anticuerpo, de las cuales sólo una posee la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, lo cual se hace usualmente por los pasos de cromatografía de afinidad, es más bien difícil, y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se divulgan en WO 93/08829 y en Traunecker y colaboradores, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios combinados de anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones de unión flexible, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) conteniendo el sitio necesario para unión de la cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en factores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo huésped apropiado. Esto facilita una gran flexibilidad en ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos del polipéptido en incorporaciones cuando proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. No obstante, es posible insertar las secuencias codificadoras para las dos o todas las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales resulta en altos rendimientos o cuando las proporciones no son de significancia particular.

En una incorporación preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones no deseadas de cadena de inmunoglobulina, en la

medida en que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de las moléculas biespecíficas ofrece un modo fácil de separación. Esta metodología se divulga en WO 94/04690. Para mayores detalles de generar anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh y colaboradores, *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en WO 96/27011 o Patente de los Estados Unidos 5,731,168, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (*por ej.*, tirosina o triptófano). "Cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena(s) lateral grande se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeñas (*por ej.*, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tales como homodímeros.

En la literatura se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlazamiento químico. Brennan y colaboradores, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en donde anticuerpos intactos se segmentan proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en la presencia de la arsenita de sodio del agente acomplejante ditiol para estabilizar ditioles vecinos e impedir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten luego en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte entonces en el derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y

acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y colaboradores, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describe la producción de moléculas de anticuerpo biespecífico $F(ab')_2$ completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se segregó separadamente de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de fijar células que sobre-expresaban el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

Se han descrito asimismo varias técnicas para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpo bivalentes directamente de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes usando cremalleras de leucina. Kostelny y colaboradores, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de unión flexible para formar monómeros y luego se re-oxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para elaborar fragmentos biespecífico/bivalentes de anticuerpo. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazante que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios fijadores de antígeno. En la misma forma se ha informado de otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecíficos/bivalentes mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber y colaboradores, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt y colaboradores, *J.*

Immunol. 147: 60 (1991).

Anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden fijarse a dos diferentes epítopos en una molécula dada. Alternativamente, un brazo anti-proteína puede combinarse con un brazo que se fija a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula de receptor de linfocito T (*por ej.*, CD2, CD3, CD28 ó B7), o receptores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), de modo que se enfoquen mecanismos de defensa celular a la célula que expresa la proteína particular. Igualmente pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos a células que expresan una proteína particular. Tales anticuerpos poseen un brazo fijador de proteína y un brazo que fija un agente citotóxico o un quelador de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés fija la proteína de interés y, además, fija el factor tisular (TF).

6) *Anticuerpos de Heteroconjugado*

Anticuerpos de heteroconjugado se encuentran también en el ámbito de la presente invención. Los anticuerpos de heteroconjugado se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, han sido propuestos para apuntar células del sistema inmunitario a células indeseadas, Patente de los Estados Unidos 4,676,980, y para tratamiento de la infección VIH. WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 0308936. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluidos aquellos que involucran agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos apropiados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los divulgados, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980. Anticuerpos de heteroconjugado pueden elaborarse usando cualesquiera métodos convenientes de entrecruzamiento.

Agentes apropiados de entrecruzamiento son bien conocidos en el arte, y se divulgan en la Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980, junto con un número de técnicas de entrecruzamiento.

7) *Ingeniería de la Función Efectora*

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, con el fin de intensificar la efectividad del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, residuo(s) de cisteína pueden introducirse en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o creciente eliminación de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron y colaboradores, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Anticuerpos homodiméricos con actividad antineoplásica mejorada pueden prepararse también usando entrecruzadores heterobifuncionales como se describe en Wolff y colaboradores, *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, puede diseñarse un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y pueda por ello tener lisis de complemento mejorada y posibilidades ADCC. Véase Stevenson y colaboradores, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

8) Inmunos conjugados

La invención concierne además a inmunos conjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (*por ej.*, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo(*es decir*, un radioconjugado).

Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunos conjugados incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina, vinblastina, adriamicina y 5-fluorouracilo.

Toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que pueden usarse

incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos no fijadores de toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

Conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se elaboran usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato dimetilico), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutareldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoyl)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolién 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceo). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta y colaboradores, *Science*, 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén triaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlazante puede ser un "enlazante segmentable" que facilite la liberación del medicamento citotóxico en la célula. Por ejemplo, pueden usarse un enlazante lábil al ácido, un enlazante sensible a peptidasa, un enlazante dimetilico o enlazante que contenga disulfuro (Chari y colaboradores, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992)).

Adicionalmente, se contemplan de igual forma las toxinas de molécula pequeña tales como caliqueamicina, maitansina (Patente de los Estados Unidos 5,208,020), tricoteno y CC1065 como toxinas conjugables para uso con la formulación inventiva. En una incorporación el anticuerpo de longitud completa o fragmentos fijadores de antígeno de los mismos pueden conjugarse a una o más moléculas maitansinoides (por ej., alrededor de 1 a

alrededor de 10 moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo). Los maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. Se han descrito maitansinoides, aislados de fuentes naturales o preparados sintéticamente, incluidos maitansina, maitansinal y derivados y análogos de los mismos, véase por ej., Patente de los Estados Unidos No. 5,208,020 y referencias citada allí (véase columna 2, renglón 53 a columna 3, renglón 10) y Patentes de los Estados Unidos 3,896,111 y 4,151,042. Métodos de preparar conjugados anticuerpo-maitansinoide se describen igualmente en la Patente de los Estados Unidos No. 5,208,020. En una incorporación preferida, un maitansinoide se enlaza al anticuerpo mediante un disulfuro u otro grupo enlazante que contenga azufre. La maitansina puede, por ejemplo, convertirse en May-SS-Me, la cual puede reducirse a May-SH₃ y hacerse reaccionar con anticuerpo modificado para generar un inmunoconjugado maitansinoide-anticuerpo. Chari y colaboradores, *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992). El anticuerpo puede modificarse por métodos conocidos, y el anticuerpo que contiene grupos tiol libres o protegidos se hace reaccionar entonces con un maitansinoide que contenga disulfuro para producir el conjugado. La citotoxicidad del conjugado anticuerpo-maitansinoide puede medirse *in vitro* o *in vivo* por métodos conocidos, y la IC₅₀ puede determinarse.

La caliqueamicina es otro inmunoconjugado de interés. La familia de caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir cortes de ADN de doble hebra en concentraciones sub-picomolares. Análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ^1 , (Hinman y colaboradores, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993) y Lode y colaboradores, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)). Otros medicamentos antineoplásicos a los que puede conjugarse el anticuerpo incluyen QFA, que es un antifolato. La caliqueamicina y QFA tienen sitios intracelulares de acción y no Cruzan fácilmente la membrana del plasma. Por lo tanto, la absorción celular de estos agentes gracias a la internalización mediada por anticuerpo mejora enormemente sus efectos

citotóxicos.

En igual forma se contemplan inmunoconjugados formados entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ej., una ribonucleasa o ADNendonucleasa tal como deoxiribonucleasa, ADNasa).

El anticuerpo puede conjugarse asimismo a un átomo altamente radioactivo. Se dispone de una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , Bi^{212} , I^{131} , In^{131} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , B^{32} y Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo Tc^{99} ó I^{123} , o una marca de espín para generación de imágenes de resonancia magnética nuclear (también conocida como generación de imágenes de resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado en formas conocidas. Por ejemplo, el peptide puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores apropiados de aminoácidos que incluyan, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99} ó I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse con un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse mediante un residuo de lisina. El método IODOGEN® puede emplearse para incorporar yodo-123, Fraker y colaboradores, *Biohem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57 (1978). Otros métodos de conjugar radionúclidos se describen en "Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy," (Chatal, CRC Press 1989).

Alternativamente, una proteína de fusión que comprenda un anticuerpo y el agente citotóxico puede elaborarse por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifiquen las dos porciones del conjugado, adyacentes entre sí o separadas por una región que codifique un péptido enlazante, que no destruya las propiedades deseadas del conjugado.

En otra incorporación, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en pre-direccionamiento

(pre-reconocimiento) tumoral en donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por eliminación del conjugado no ligado de la circulación usando un agente depurador y, en seguida, administración de un "ligando" (*por ej.*, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (*por ej.*, un radionucleótido).

9) Inmunoliposomas

Los anticuerpos divulgados aquí pueden formularse asimismo como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesicular compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactante, que es útil para administración de un medicamento a un mamífero. Los componentes del liposome se disponen comúnmente en una formación bicapa, similar a la disposición del lípido de las membranas biológicas.

Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en el arte, tales como los descritos en Epstein y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang y colaboradores, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); y las Patentes de los Estados Unidos No. 4,485,045 y 4,544,545. Liposomas con tiempo mejorado de circulación se divulgan en la Patente de los Estados Unidos No. 5,013,556.

Liposomas particularmente útiles pueden generarse por el método de evaporación de fase reversa con una composición de lípidos que comprenda fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado. Fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse a los liposomas como se describe en Martin y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina) se encuentra contenido opcionalmente en el liposoma. Véase Gabizon y colaboradores, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484(1989).

10) *Otras Modificaciones de Anticuerpos*

Aquí se contemplan otras modificaciones de anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo puede enlazarse a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ej., polietilen glicol, polipropilen glicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilen glicol y polipropilen glicol. En igual forma anticuerpo puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de aglomeración o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas coloidales de administración de medicamentos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas y otras formulaciones apropiadas se divulgan en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

C. Formulaciones Liofilizadas

Las formulaciones descritas aquí pueden prepararse también como formulaciones liofilizadas reconstituidas. Las proteínas o anticuerpos descritos aquí se liofilizan y luego se reconstituyen para producir las formulaciones líquidas estables, de viscosidad reducida, de la invención. En esta incorporación particular, luego de la preparación de la proteína de interés, como se describe más arriba, se produce una "formulación pre-liofilizada". La cantidad de proteína presente en la formulación pre-liofilizada se determina tomando en cuenta los volúmenes deseados de la dosis, modo(s) de administración, etc. Por ejemplo, la concentración inicial de un anticuerpo intacto puede ser de alrededor de 2 mg/ml a alrededor de 50 mg/ml, preferiblemente de alrededor de 5 mg/ml a alrededor de 40 mg/ml y, muy preferiblemente, de alrededor de 20-30 mg/ml.

1) Preparación de Formulaciones Liofilizadas

Por lo general, la proteína a formularse está presente en solución. Por ejemplo, en las formulaciones de viscosidad reducida y elevada saturación

iónica de la invención, la proteína puede estar presente en una solución tamponada en su pH en un pH de alrededor de 4-8 y, preferiblemente, de alrededor de 5-7. La concentración del tampón puede ser de alrededor de 1 mM a alrededor de 20 mM, alternativamente de alrededor de 3 mM a alrededor de 15 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y de la tonicidad deseada de la formulación (*por ej.*, de la formulación reconstituida). Tampones y/o sales ejemplares son aquellos que son farmacéuticamente aceptables y pueden crearse de ácidos apropiados, bases y sales de los mismos, tales como los que se definen bajo ácidos, bases o tampones "farmacéuticamente aceptables".

En una incorporación, se agrega un lioprotector a la formulación pre-liofilizada. La cantidad de lioprotector en la formulación pre-liofilizada es generalmente tal que, con la reconstitución, la formulación resultante será isotónica. No obstante, también pueden ser adecuadas formulaciones reconstituidas hipertónicas. Adicionalmente, la cantidad de lioprotector no tiene que ser demasiado baja, de modo que con la liofilización ocurra una cantidad inaceptable de degradación/agregación de la proteína. Sin embargo, concentraciones de lioprotector ejemplares en la formulación pre-liofilizada son de alrededor de 10 mM a alrededor de 400 mM, alternativamente de alrededor de 30 mM a alrededor de 300 mM, alternativamente de alrededor de 50 mM a alrededor de 100 mM. Lioprotectores ejemplares incluyen azúcares y alcoholes de azúcar tales como sacarosa, mannososa, trehalosa, glucosa, sorbitol, manitol. Sin embargo, bajo circunstancias particulares, ciertos lioprotectores pueden contribuir igualmente a un aumento en la viscosidad de la formulación. Como tales, debe tenerse cuidado, de modo que se seleccionen lioprotectores particulares, que minimicen o neutralicen este efecto. Lioprotectores adicionales se describen anteriormente bajo la definición de "lioprotectores", también denominados aquí "azúcares farmacéuticamente aceptables".

La proporción de proteína a lioprotector puede variara para cada proteína o anticuerpo particular y combinación de lioprotector. En el caso de un anticuerpo como la proteína de elección y un azúcar (*por ej.*, sacarosa o

trehalosa) como el lioprotector para generar una formulación reconstituida isotónica con una elevada concentración de proteína, la relación molar de lioprotector a anticuerpo puede ser de alrededor de 100 a alrededor de 1500 moles de lioprotector a 1 mole de anticuerpo y, preferiblemente, de alrededor de 200 a alrededor de 1000 moles de lioprotector a 1 mole de anticuerpo, por ejemplo de alrededor de 200 a alrededor de 600 moles de lioprotector a 1 mole de anticuerpo.

En una incorporación preferida, puede ser deseable añadir un tensoactivo a la formulación pre-liofilizada. Alternativamente, o en adición, el tensoactivo puede agregarse a la formulación liofilizada y/o la formulación reconstituida. Tensoactivos ejemplares incluyen tensoactivos no iónicos tales como polisorbatos (*por ej.*, polisorbatos 20 u 80); polioxámeros (*por ej.*, poloxámero 188); Triton; octal glucósido sódico; lauril-, , miristil-, linoleil-, o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil-, o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-betaína (*por ej.*, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil-, o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil-taurato sódico, o metil oleil-taurato disódico; y la series MONAQUA™ (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey), polietil glicol, polipropil glicol, y copolímeros de etilen y propilen glicol (*por ej.*, Pluronic, PF68 *etc*). La cantidad de tensoactivo agregado es tal que reduzca la formación de particulado de la proteína reconstituida y minimice la formación de particulados luego de la reconstitución. Por ejemplo, el tensoactivo puede estar presente en la formulación pre-liofilizada en una cantidad de alrededor de 0.001-0.5%, alternativamente de alrededor de 0.005-0.05%.

Una mezcla del lioprotector (tal como sacarosa o trehalosa) y un agente de relleno (*por ej.*, mannitol o glicina) pueden usarse en la preparación de la formulación de pre-liofilización. El agente de relleno puede permitir la producción de una torta liofilizada uniforme sin bolsas excesivas en ella, *etc*. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables,

excipientes o estabilizantes tales como los descritos en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) pueden incluirse en la formulación pre-liofilizada (y/o la formulación liofilizada y/o la formulación reconstituida), con la condición de que no afecten negativamente las características deseadas de la formulación. Vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos a los receptores en las posologías y concentraciones empleadas e incluyen agentes tamponantes adicionales; preservantes; co-disolventes; antioxidantes incluidos ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos de metal (*por ej.*, complejos Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraponos formadores de sales, tales como sodio

La formulación mencionada aquí puede contener asimismo más de una proteína, según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no afectan negativamente a la otra proteína. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar dos o más anticuerpos que se fijan a la diana deseada (*por ej.*, receptor o antígeno) en una formulación única. Tales proteínas están convenientemente presentes en combinación en cantidades que sean efectivas para el propósito previsto.

Las formulaciones a usarse para administración *in vivo* tienen que ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril, antes de, o luego de, la liofilización y reconstitución. Alternativamente, la esterilidad de toda la mezcla puede conseguirse sometiendo a la acción de un autoclave los ingredientes, excepto la proteína, a alrededor de 120°C por alrededor de 30 minutos, por ejemplo.

Una vez mezclados juntos la proteína, el lioprotector opcional y otros componentes opcionales, se liofiliza la formulación. Para este propósito se encuentran disponibles diferentes secadores por congelamiento, tales como Hull50™ (Hull, USA) o secadores por congelamiento GT20™ (Leybold-Heraeus, Alemania). El secamiento por congelamiento se lleva a cabo congelando la formulación y, posteriormente, sublimando el hielo del contenido congelado a una temperatura adecuada para secamiento primario.

Bajo esta condición, la temperatura del producto está por debajo de punto eutéctico o la temperatura del colapso de la formulación. Típicamente, la temperatura del entrepaño ("*shelf temperature*") para el secamiento primario variará de alrededor de -30 a 25°C (con la condición de que el producto permanezca congelado por el secamiento primario) a una presión apropiada, que varía típicamente de alrededor de 50 a 250 mTorr. La formulación, tamaño y tipo del envase que contiene la muestra (*por ej.*, ampolla de vidrio) y el volumen de líquido dictarán básicamente el tiempo requerido para secamiento, el cual puede variar desde unas cuantas horas a varios días (*por ej.*, 40-60 horas). Opcionalmente, puede llevarse asimismo a cabo una segunda etapa de secamiento secundario, dependiendo del nivel de humedad residual deseada en el producto. La temperatura a la cual se lleva a cabo el secamiento secundario varía de alrededor de 0-40°C, dependiendo principalmente del tipo y el tamaño del envase y el tipo de proteína empleada. Por ejemplo, la temperatura del entrepaño de principio a fin de toda la fase de retiro del agua de liofilización puede ser de alrededor de 15-30°C (*por ej.*, alrededor de 20°C). El tiempo y la presión requeridos para el secamiento secundario serán los que produzcan una torta liofilizada apropiada, dependientes, *por ej.*, de la temperatura y otros parámetros. El tiempo de secamiento secundario lo dicta el nivel de humedad residual deseada en el producto y, típicamente, toma por lo menos alrededor de 5 horas (*por ej.*, 10-15 horas). La presión puede ser la misma que la empleada por el paso de secamiento primario. Las condiciones de secamiento por congelamiento pueden variarse dependiendo de la formulación y el tamaño de la ampolla.

2. Reconstitución de la Formulación Liofilizada

Antes de la administración al paciente, la formulación liofilizada se reconstituye con un diluyente farmacéuticamente aceptable, de modo que la concentración de la proteína en la formulación reconstituida sea por lo menos alrededor de 50 mg/ml, por ejemplo de alrededor de 50 mg/ml a alrededor de 400 mg/ml, alternativamente de alrededor de 80 mg/ml a alrededor de 300

mg/ml, alternativamente de alrededor de 90 mg/ml a alrededor de 150 mg/ml. Se considera que tales altas concentraciones de proteína en la formulación reconstituida son particularmente útiles donde se prevé la administración subcutánea de la formulación reconstituida. No obstante, para otras vías de administración, tales como administración intravenosa, pueden ser deseables concentraciones más bajas de la proteína en la formulación reconstituida (por ejemplo de alrededor de 5-50 mg/ml, o de alrededor de 10-40 mg/ml de proteína en la formulación reconstituida). En ciertas incorporaciones, la concentración de proteína en la formulación reconstituida es significativamente más alta que la de la formulación pre-lioofilizada. Por ejemplo, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser alrededor de 2-40 veces, alternativamente 3-10 veces, alternativamente 3-6 veces (*por ej.*, por lo menos el triple o por lo menos el cuádruple) de la de la formulación pre-lioofilizada.

Por lo general la reconstitución tiene lugar a una temperatura de alrededor de 25°C para garantizar una completa hidratación, si bien pueden emplearse otras temperaturas, según se desee. El tiempo requerido para la reconstitución dependerá, *por ej.*, del tipo de diluyente, la cantidad de excipiente(s) y proteína. Diluyentes ejemplares incluyen agua esterilizada, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución tamponada en su pH (*por ej.*, salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de cloruro sódico compuesto ("*Ringers' solution*") o solución de dextrosa. Opcionalmente el diluyente contiene un preservante. Preservantes ejemplares se han descrito anteriormente, siendo los alcoholes aromáticos, tales como alcohol bencílico o fenólico, los preservantes preferidos. La cantidad de preservante empleado se determina evaluando diferentes concentraciones de preservante en cuanto a su compatibilidad con la proteína y probando la eficacia del preservante. Por ejemplo, si el preservante es un alcohol aromático (tal como alcohol bencílico), éste puede estar presente en una cantidad de alrededor de 0.1-2.0% y, preferiblemente, de alrededor de 0.5-1.5%, pero muy preferiblemente alrededor de 1.0-1.2%.

Preferiblemente, la formulación reconstituida tiene menos de 6000

partículas por ampolla que son $\geq 10 \mu\text{m}$ en tamaño.

D. Formulaciones Líquidas

Formulaciones terapéuticas se preparan para almacenamiento mezclando el ingrediente activo, que tiene el grado deseado de pureza, con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 18th edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 [1990]). Vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables son no tóxicos a los pacientes en las posologías y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, antioxidantes incluidos ácido ascórbico, metionina, Vitamina E, metabisulfito sódico; preservantes; isotonicificadores, estabilizantes, complejos de metal (*por ej.*, complejos Zn-proteína); agentes quelantes tales como EDTA y/o tensoactivos no iónicos.

Cuando el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que específicamente se fija al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse fragmentos de anticuerpo o incluso moléculas de péptidos, las cuales conservan la capacidad de fijar la secuencia de proteína diana. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante (véase, *por ej.*, Marasco y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7889-7893 [1993]).

Los tampones se usan para controlar el pH en un margen que optimiza la eficacia terapéutica, especialmente si la estabilidad es dependiente del pH. Los tampones se encuentran preferiblemente presentes en concentraciones que varían de alrededor de 50 mM a alrededor de 250 mM. Agentes tamponantes apropiados para uso con la presente invención incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sus bases. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Adicionalmente, los tampones pueden estar conformados por sales de histidina y trimetilamina tales como Tris.

Se añaden preservantes para retardar el crecimiento microbiano, y típicamente están presentes en un margen de 0.2% - 1.0% (p/v). Preservantes apropiados para uso con la presente invención incluyen (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalconio (*por ej.*, cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de bencetonio; timerosal, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol, y *m*-cresol.

Agentes de tonicidad, a veces conocidos como "estabilizantes" están presentes para ajustar o mantener la tonicidad de una composición líquida. Cuando se usan con biomoléculas cargadas, grandes, tales como proteínas y anticuerpos, se denominan a menudo "estabilizantes", porque pueden interactuar con los grupos cargados de las cadenas laterales de aminoácidos, disminuyendo así el potencial de interacciones inter e intramoleculares. Los agentes de tonicidad pueden estar presentes en cualquier cantidad entre 0.1% a 25% en peso, preferiblemente 1 a 5%, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los demás ingredientes. Los agentes de tonicidad incluyen alcoholes polihídricos de azúcar, preferiblemente alcoholes de azúcar trihídricos o mayores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

Excipientes adicionales incluyen agentes que pueden servir como uno o más de los siguientes: (1) agentes de relleno, (2) mejoradores de solubilidad, (3) estabilizantes y (4) agentes que impiden la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizantes pueden estar presentes en el margen de 0.1 a 10,000 partes por peso de proteína activa o anticuerpo. Estabilizantes típicos incluyen: alcoholes de azúcar polidricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, *etc.*; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar tales como sacarosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquiosa, mannososa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitales (*por ej.*, inositol),

polietilen glicol; agentes reductores con contenido de azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos (*por ej.*, xilosa, mannososa, fructosa, glucosa; disacáridos (*por ej.*, lactosa, maltosa, sacarosa); trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrina o dextrano.

Tensoactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") están presentes para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por la agitación, lo cual permite además que la formulación se exponga a esfuerzo superficial de cizalladura sin causar la desnaturalización de la proteína terapéutica activa o anticuerpo. Surfactantes no iónicos están presentes en un margen de alrededor de 0.05 mg/ml a alrededor de 1.0 mg/ml, preferiblemente alrededor de 0.07 mg/ml a alrededor de 0.2 mg/ml.

Tensoactivos no iónicos apropiados incluyen polisorbatos (20, 40, 60, 65, 80, *etc.*), polioxámeros (184, 188, *etc.*), polioles Pluronic®, Triton, polioxietilen sorbitán, monoéteres (Tween®-20, Tween®-80, *etc.*), lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerina, éster de ácido graso de sacarosa, metilceluosa y carboximetilcelulosa. Detergentes aniónicos que pueden usarse incluyen lauril sulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y dioctil sulfonato de sodio. Detergentes catiónicos incluyen cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio.

Con el fin de que las formulaciones puedan usarse en administración *in vivo*, tienen que ser estériles. La formulación puede hacerse estéril mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas incluidas aquí se ponen por lo general en un envase que contiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa para solución intravenosa o ampolla que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección

hipodérmica.

La vía de administración está de acuerdo con métodos conocidos y aceptados, tales como inyección i.v. rápida única o múltiple o infusión por un período prolongado de tiempo en una manera apropiada, *por ej.*, inyección o infusión por vías subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales, intramusculares, intra-arteriales, intralesionales o intra-articulares, administración tópica, inhalación o por medios de liberación sostenida o liberación ampliada.

La formulación mencionada aquí puede contener además más de un compuesto activo, según sea necesario, para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Alternativamente, o en adición, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina o agente inhibidor de crecimiento. Tales moléculas están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito previsto.

En igual forma los ingredientes activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de aglomeración o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de medicamentos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18th edition, más arriba.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en la forma de artículos moldeados, *por ej.*, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato etilen-vinílico, no degradable, copolímeros

degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como los LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida se ha llevado exitosamente a cabo con somatotropina humana (rhGH), interferón-(rhIFN-), interleucina-2, y MN rpg 120. Johnson y colaboradores, *Nat. Med.* 2: 795-799 (1996); Yasuda y colaboradores, *Biomed. Ther.* 27: 1221-1223 (1993); Hora y colaboradores, *Bio/Technology* 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: New York, 1995), páginas 439-462; WO 97/03692; WO 96/40072; WO 96/07399; y Patente de los Estados Unidos No. 5,654,010.

Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas pueden desarrollarse usando polímero de ácido poliláctico-ácido poliglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplia gama de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos lácticos y glicólicos, pueden eliminarse rápidamente en el cuerpo humano. Más aún, la degradabilidad de este polímero puede ajustarse desde meses a años dependiendo de su peso molecular y la composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", in *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker; New York, 1990), M. Chasin and R. Langer (Eds.) páginas 1-41.

Aunque polímeros tales como etilen-vinil acetato ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas por más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más breves. Cuando anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo por un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y cambios posibles en la inmunogenicidad. Pueden concebirse estrategias razonables para la estabilización, dependiendo del mecanismo

involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace S-S intermolecular mediante intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específica.

Igualmente pueden usarse composiciones liposomales o proteinoides para formular las proteínas o anticuerpos divulgados aquí. Véase las Patentes de los Estados Unidos No. 4,925,673 y 5,013,556.

La estabilidad de las proteínas y anticuerpos descritos aquí pueden mejorarse mediante el uso de "sales de metal polivalente, solubles en agua". Ejemplos incluyen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} y Al^{3+} . Aniones ejemplares que pueden formar sales solubles en agua con los anteriores cationes de metal polivalente incluyen las formadas de ácidos inorgánicos y/o ácidos orgánicos. Tales sales solubles en agua tienen una solubilidad en agua (a 20°C) de por lo menos alrededor de 20 mg/ml; alternativamente por lo menos alrededor de 100 mg/ml, alternativamente por lo menos alrededor de 200 mg/ml.

Ácidos inorgánicos apropiados que pueden emplearse para formar las "sales de metal polivalente, solubles en agua" incluyen ácido clorhídrico, acético, sulfúrico, nítrico, tiociánico y fosfórico. Ácidos orgánicos adecuados que pueden utilizarse incluyen ácido alifático carboxílico y ácidos aromáticos. Ácidos alifáticos dentro de esta definición pueden definirse como ácidos C_{2-9} carboxílicos saturados o insaturados (por ej., ácidos alifáticos mono-, di- y tri-carboxílicos). Por ejemplo, ácidos monocarboxílicos ejemplares dentro de esta definición incluyen los ácidos C_{2-9} monocarboxílicos saturados acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, enántico, caprílico pelargónico y caprónico, y los ácidos C_{2-9} monocarboxílicos insaturados ácidos acrílico, propioico metacrílico, crotónico e isocrotónico. Ácidos dicarboxílicos ejemplares incluyen los ácidos C_{2-9} dicarboxílicos saturados malónico, succínico, glutárico, adípico y pimélico, mientras que ácidos C_{2-9} dicarboxílicos insaturados incluyen ácidos

maleico, fumárico, citracónico y mesacónico. Ácidos tricarboxílicos ejemplares incluyen los ácidos C₂₋₉ tricarboxílicos saturados ácido tricarbálico y 1,2,3-butanotricarboxílico. Adicionalmente, los ácidos carboxílicos de esta definición incluyen además uno o dos grupos hidroxilo para formar ácidos hidroxí carboxílicos. Ácidos hidroxí carboxílicos ejemplares incluyen ácido glicólico, láctico, glicérico, tartrónico, málico, tartárico y cítrico. Ácidos aromáticos dentro de esta definición incluyen ácido benzoico y salicílico.

Sales de metal polivalente solubles en agua, comúnmente empleadas, que pueden usarse para ayudar a estabilizar los polipéptidos encapsulados de esta invención incluyen, por ejemplo: (1) las sales de metal de ácido inorgánico de haluros (*por ej.*, cloruro de zinc, cloruro de calcio), sulfatos, nitratos, fosfatos y tiocianatos; (2) las sales de metal de ácido alifático carboxílico (*por ej.*, acetato de calcio, acetato de zinc, proprionato de calcio, glicolato de zinc, lactato de calcio, lactato de zinc y tartrato de zinc); y (3) las sales de metal de ácido carboxílico aromático de benzoatos (*por ej.*, benzoato de zinc) y salicilatos.

E. Métodos de Tratamiento:

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la posología apropiada de un agente activo, dependerá del tipo de enfermedad a tratarse, como se define anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente, y la discreción del médico residente. El agente se administra convenientemente al paciente de una vez o por una serie de tratamientos.

Un método preferido de tratamiento es el tratamiento del trastorno mediado por IgEs. Trastornos mediados por IgE incluyen trastornos atópicos, que se caracterizan por la propensión heredada a responder inmunológicamente a muchos antígenos inhalados e ingeridos, comunes, que ocurren naturalmente, y la producción continua de anticuerpos IgE. Trastornos atópicos específicos incluyen asma alérgica, rinitis alérgica,

dermatitis atópica y gastroenteropatía alérgica. A menudo los pacientes atópicos tienen múltiples alergias, significando que tienen anticuerpos IgE para, y síntomas de, muchos alérgenos ambientales, incluidos pólenes, hongos (*por ej.*, mohos), desechos de animales y de insectos y ciertos alimentos.

No obstante, trastornos asociados con niveles IgE elevados no se limitan a aquellos con una etiología heredada (atópica). Otros trastornos asociados con niveles IgE elevados, que parecen ser mediados por IgE y que son susceptibles de tratarse con la formulaciones de esta presente invención incluyen hipersensibilidad (*por ej.*, hipersensibilidad anafiláctica), eczema, urticaria, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasitarias, síndrome hiper-IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoplasia tímica, mieloma IgE y reacción injerto-versus-huésped.

Rinitis alérgica, también conocida como rinoconjuntivitis alérgica o rinitis polínica, es la manifestación más común de una reacción atópica a alérgenos inhalados, cuya gravedad y duración es a menudo correlativa con la intensidad y la duración de la exposición al alérgeno. Es una enfermedad crónica, que puede aparecer en cualquier edad, pero la manifestación ocurre habitualmente durante la niñez o la adolescencia. Un ataque típico consiste de rinorrea acuosa profusa, estornudo paroxístico, obstrucción nasal y picazón de la nariz y el paladar. El drenaje de la mucosidad posnasal ocasiona asimismo dolor de garganta, carraspeo y tos. Puede haber también síntomas de blefaroconjuntivitis alérgica, con intensa picazón de las conjuntivas y los párpados, eritema, lacrimación, y fotofobia. Ataques graves se acompañan a menudo por malestar sistémico, debilidad, fatiga y, a veces, dolor muscular luego de intensos períodos de estornudos.

Asma, también conocida como enfermedad obstructiva reversible de las vías respiratorias, se caracteriza por hiperreactividad del árbol traqueobronquial a irritantes respiratorios y químicos broncoconstrictores, que producen ataques de jadeo, disnea, opresión en el pecho y tos, que son reversibles espontáneamente o con tratamiento. Es una enfermedad crónica que compromete todas las vías respiratorias, pero varía en gravedad desde

episodios transitorios leves ocasionales a obstrucción bronquial crítica, crónica, grave. El asma y la hipersensibilidad ("*atopy*") pueden coexistir, pero sólo aproximadamente la mitad de los asmáticos son también hipersensibles, y un porcentaje incluso menor de pacientes hipersensibles pueden tener también asma. No obstante, la hipersensibilidad y el asma no son completamente independientes en el sentido en que el asma ocurra más frecuentemente entre individuos hipersensibles que entre no hipersensibles, especialmente por la niñez. Además, históricamente el asma se ha subdividido en dos grupos, asma extrínseca y asma intrínseca.

El asma extrínseca, también conocida como asma alérgica, hipersensible o inmunológica, es descriptiva de pacientes que generalmente desarrollan asma en una etapa muy temprana de su vida, usualmente por la infancia o la niñez. Con frecuencia coexisten otras manifestaciones de hipersensibilidad, incluidos eczema o rinitis alérgica. Los ataques asmáticos pueden ocurrir por épocas de polinización, en la presencia de animales, o con la exposición al polvo doméstico, almohadas de plumas, u otros alérgenos. Exámenes de piel muestran reacciones positivas de roncha y zona de enrojecimiento a los alérgenos causantes. Interesantemente, la concentración de IgE sérica total es frecuentemente elevada, pero es a veces normal.

El asma intrínseca, también conocida como asma no alérgica o idiopática, ocurre por lo general por primera vez por la vida adulta, luego de la infección respiratoria aparente. Los síntomas incluyen obstrucción bronquial crónica o recurrente no relacionada con temporadas de polinización o exposición a otros alérgenos. Los exámenes de piel son negativos a los alérgenos atópicos usuales, la concentración de IgE sérica es normal. Los síntomas adicionales incluyen sangre en el esputo y eosinofilia. Otros esquemas para clasificar el asma en subgrupos, como sensibles a la aspirina, inducidos por el ejercicio, infecciosos y psicológicos definen meramente factores desencadenantes externos, que afectan a ciertos pacientes más que a otros.

Finalmente, es importante anotar que aunque algunas clasificaciones han asociado históricamente sólo el asma alérgica con dependencia de IgE,

existen ahora datos de fuerte significación estadística que muestran una correlación entre IgE y asma (alérgica y no alérgica). Capítulo 27, "The Atopic Diseases", A.I. Terr in Medical Immunology, 9th Ed., Simon and Schuster, Stites y colaboradores, Ed. (1997). Como resultado, el término "trastornos mediado por IgE", para efectos de esta solicitud de patente, incluye asma alérgica y asma no alérgica.

Signos físicos de un ataque de asma incluyen respiración anormalmente rápida, jadeo audible, y uso de músculos accesorios de la respiración. Por lo general, pulso rápido y elevada presión sanguínea se encuentran también presentes, como elevados niveles de eosinófilos en la sangre periférica y secreciones nasales. Las funciones pulmonares muestran una disminución en las velocidades de flujo y 1 segundo volumen expiratorio forzado (FEV₁). La capacidad pulmonar total y la capacidad residual funcional son típicamente normales o se aumentan ligeramente, pero pueden disminuir con broncoespasmo extremo.

La patología del asma puede distinguirse por reacciones de fase temprana y fase tardía. La fase temprana se caracteriza por contracción de los músculos lisos, edema e hipersecreción, mientras que las reacciones de fase tardía se caracterizan por inflamación celular. El asma puede inducirse por varios desencadenantes no específicos incluidas infecciones (*por ej.*, infecciones respiratorias víricas), factores fisiológicos (*por ej.*, ejercicio, hiperventilación, respiración profunda, factores psicológicos), factores atmosféricos (*por ej.*, dióxido de azufre, amoníaco, aire frío, ozono, vapor de agua destilada), ingestas (*por ej.*, propranolol, aspirina, medicamentos antiinflamatorios no esteroides), inhalantes experimentales (*por ej.*, soluciones hipertónicas, ácido cítrico, histamina, metacolina, prostaglandina F_{2a}) e inhalantes ocupacionales (*por ej.*, isocianatos). Varios alérgenos ocupacionales o ambientales adicionales que causan asma alérgica pueden incluir, productos animales, polvos para insectos, creaturas de mar, productos vegetales, frutas, semillas, hojas y pólenes, tinturas orgánicas y tintas, agentes microbianos, enzimas, agentes terapéuticos, agentes esterilizantes, productos químicos orgánicos e inorgánicos.

Dermatitis atópica, también conocida como eczema, neurodermatitis, eczema atópico o prurigo de Besnier, es un trastorno cutáneo crónico común, específico de un subgrupo de pacientes con las características familiares e inmunológicas de la hipersensibilidad. La característica esencial es una respuesta inflamatoria dérmica acompañada de prurito, que induce una erupción cutánea simétricamente distribuida, característica, con predilección por ciertos sitios. Existe también una frecuente sobreproducción de IgE por linfocitos B. Aunque la dermatitis atópica se clasifica como una forma cutánea de hipersensibilidad, porque se asocia con rinitis alérgica y asma y altos niveles de IgE; la gravedad de la dermatitis, sin embargo, no siempre se correlaciona con exposición a alérgenos en pruebas cutáneas, y la desensibilización (a diferencia de otras enfermedades alérgicas) no es un tratamiento efectivo. Aunque la IgE sérica alta es confirmatoria de un diagnóstico de asma alérgica, los niveles normales no la excluyen. La aparición de la enfermedad puede ocurrir en cualquier edad, ay las lesiones comienzan de manera aguda con pápulas edematosas eritematosas o placa con descamación. La comezón lleva a supuración y formación de costras, luego a endurecimiento crónico de la piel. A nivel celular, la lesión aguda es hinchazón del tejido cutáneo y la dermis se infiltra con células mononucleares, linfocitos CD4. Neutrófilos, eosinófilos, células del plasma y basófilos son raros, pero están presentes mastocitos desgranulados. Lesiones crónicas caracterizan la hiperplasia epidérmica, hiperqueratosis y paraqueratosis, y la dermis se infiltra con células mononucleares, células de Langhans y mastocitos. Existen asimismo áreas focales de fibrosis, incluida la implicación del perineurio de los nervios pequeños.

Gastroenteropatía alérgica, también conocida como gastroenteropatía eosinofila, es una manifestación atópica inusual en la cual múltiples sensibilidades a alimentos producidas por la IgE se asocian con una reacción mucosal local del tracto gastrointestinal. Es rara en adultos, aunque más común, pero transitoria, en infantes. La condición resulta cuando alérgenos de alimento ingerido reaccionan con anticuerpos de IgE local en la mucosa del yeyuno y liberan mediadores de mastocitos, resultantes en síntomas

gastrointestinales poco tiempo después de la comida. La exposición continua produce inflamación crónica, resultante en pérdida de proteínas gastrointestinales y edema hipoproteinéxico. La pérdida de sangre a través de la mucosa intestinal inflamada puede ser suficientemente significativa para causar anemia deficiencia de hierro. La reacción alérgica ocurre localmente en la mucosa gastrointestinal superior luego de la exposición al alérgeno, pero se soluciona evitando el alérgeno.

Anafilaxis y urticaria son claramente mediadas por IgE, pero carecen de determinantes genéticos, y no tienen predilección por individuos atópicos. La anafilaxis es una reacción alérgica generalizada, aguda, con implicación simultánea de varios sistemas de órganos, usualmente cardiovascular, respiratorio, cutáneo y gastrointestinal. La reacción es mediada inmunológicamente, y ocurre con la exposición a un alérgeno al cual el sujeto ha sido previamente sensibilizado. Urticaria y angioedema se refieren a la hinchazón física, eritema y picazón resultantes de receptor estimulado por histamina en vasos sanguíneos cutáneos superficiales, y es la característica cutánea con sello de marca de la anafilaxis cutánea. La anafilaxis sistémica es la ocurrencia de una reacción mediada por IgE simultáneamente en múltiples órganos, resultante de medicamento, veneno de insecto o alimento. Es causada súbitamente por IgE con carga de mastocitos, inducida por alérgenos, resultante en una profunda y crítica alteración en el funcionamiento de varios órganos vitales. Colapso vascular, obstrucción aguda de las vías respiratorias, vasodilatación cutánea y edema, espasmo muscular gastrointestinal y genitourinario ocurren casi simultáneamente, aunque no siempre en el mismo grado.

La patología de la anafilaxis incluye angioedema y pulmones hiperinflamados, con taponamiento mucoso de las vías respiratorias y atelectasis focal. A nivel celular, los pulmones adquieren el mismo aspecto que por un ataque de asma agudo, con hipersecreción de las glándulas submucosas bronquiales, edema mucoso y submucoso, congestión vascular peribronquial y eosinofilia en las paredes bronquiales. Se pueden presentar edema pulmonar y hemorragia. De igual modo se pueden presentar espasmo

muscular bronquial, hiperdistensión, e incluso ruptura de los alvéolos. Una característica importante de la anafilaxis humana incluye edema, congestión vascular, y eosinofilia en la *lamina propria* de la laringe, tráquea, epiglotis e hipofaringe.

La exposición al alérgeno puede producirse por ingestión, inyección, inhalación o contacto con la piel o la membrana mucosa. La reacción empieza en el término de segundos o minutos después de la exposición al alérgeno. Puede haber un susto inicial o sensación de muerte inminente, seguido rápidamente por síntomas en uno o más sistemas de órganos diana: cardiovascular, respiratorio, cutáneo y gastrointestinal.

Los alérgenos responsables de la anafilaxis difieren de los comúnmente asociados con hipersensibilidad. Alimentos, medicamentos, venenos de insectos o látex son las fuentes comunes. Los alérgenos de alimentos incluyen los hallados en crustáceos, moluscos (*por ej.*, langosta, camarones, cangrejo), pescado, legumbres (*por ej.*, cacahuets, guisantes, frijoles, regaliz), semillas (*por ej.*, ajonjolí, semilla de algodón, alcaravea, mostaza, semilla de lino, girasol), nueces, bayas, claras de huevo, trigo negro y lecha. Los alérgenos de medicamentos incluyen los hallados en proteínas heterólogas y polipéptidos, polisacáridos y medicamentos hapténicos. Alérgenos de insectos incluyen insectos himenópteros, incluidos la abeja, avispas amarillas, avispones, avispas y hormigas.

Aunque la epinefrina es el tratamiento típico para la anafilaxis, por lo general se prescriben antihistamina o y otros bloqueadores de histaminae para urticaria menos grave o reacción angioedémica.

F. Terapias de Combinación

El método de la invención puede combinarse con métodos conocidos de tratamiento para el trastorno mediado por IgE, ya sea como pasos de tratamiento, combinados o adicionales, o ya sea como componentes adicionales de una formulación terapéutica.

Por ejemplo, antihistaminas, especialmente antihistaminas no sedantes pueden administrarse antes, previamente a, o en proporción con los

anticuerpos anti-IgE de la invención. Antihistaminas adecuadas incluyen las de la alquilamina (*por ej.*, clorfeniramina), etanolamina (*por ej.*, difenhidramina) y fenotiazina (*por ej.*, prometazina). Aunque muchas antihistaminas antagonizan los efectos farmacológicos de la histamina bloqueando sus sitios de receptor en las células efectoras, otros medicamentos comunes antihistamina operan bloqueando la liberación de histamina de mastocitos que se han sensibilizado y armado con IgE específica de alérgeno (*por ej.*, cromolina sódica). Antihistaminas ejemplares incluyen astemizol, maleato de azatadina, maleato de brofeniramina, maleato de carbinoxamina, clorhidrato de cetirizina, fumarato de clemastina, clorhidrato de ciproheptadina, maleato de dexbromfeniramina, maleato de dexclorfeniramina, dimenhidrinato, clorhidrato de difenhidramina, succinato de doxilamina, clorhidrato de fexofendadina, clorhidrato de terfenadina, clorhidrato de hidroxzina, loratidina, clorhidrato de meclizina, citrato de tripelannamina, clorhidrato de tripelennamina, clorhidrato de triprolidina.

Síntomas particulares de trastornos mediados por IgE (*por ej.*, reacciones de fase temprana) pueden mejorarse con simpatomiméticos o medicamentos que posean efecto broncodilatador. La epinefrina es un alfa y beta adrenérgico de amplio espectro administrado a menudo por vía subcutánea en una dosis 0.2 - 0.5 mL de solución acuosa 1:100. Se usa asimismo una epinefrina de acción más prolongada (*es decir*, terbutalina) en una suspensión 1:200 cuando se desea un efecto de mayor duración. Otros beta adrenérgicos apropiados incluyen albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol, isoetarina y formoterol para administración por vía nasal (*por ej.*, nebulizador manual, respirador intermitente de presión positiva, o inhaladores presurizados de dosis medida) o por vía oral.

La broncodilatación puede lograrse mediante la administración de xantinas, especialmente cuando éstas se administran en combinación con los medicamentos simpatomiméticos anteriores. Xantinas ejemplares incluyen aminofilinas (i.v. 250-500 mg) y teofilina (oral, 10-20 µg/ml de concentración sérica).

Otros síntomas de varios trastornos mediados por IgE (*por ej.*, reacciones de fase tardía) pueden atenuarse por tratamiento con glucocorticoides o demás medicamentos que poseen efectos antiinflamatorios. Prednisona (30-60 mg diariamente) se administra sistemáticamente para ataques graves, mientras que el dipropionato de beclometasona, acetónido de triamcinolona y flunisolida se administran en forma de aerosol como terapia de mantenimiento a largo plazo. Corticosteroides adicionales que tienen efectos antiinflamatorios incluyen: betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de fludrocortisona, flunisolida, propionato de fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona.

Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos que pueden utilizarse asimismo en combinación con los métodos terapéuticos de la invención incluyen, acetaminofén, aspirina, bromfenac sódico, diclofenac sódico, diflunisal, etodolac, fenoprofeno cálcico, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, meclofenamato sódico, ácido mefenámico, nabumetona, naproxeno, naproxeno sódico, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina sódica.

Adicionalmente, el beneficio terapéutico máximo puede lograrse con la administración de descongestionantes (*por ej.*, fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudoefedrina), antitusígenos (*por ej.*, dextrometorfano, codeína, o hidrocodona) o analgésicos (*por ej.*, acetaminofén, aspirina).

La desensibilización al alérgeno es una forma de tratamiento en la cual se inyectan alérgenos al paciente con el fin de reducir o eliminar la respuesta alérgica. Se conoce asimismo como inmunoterapia de alérgeno, hiposensibilización o terapia de inyección de alergia. A menudo se usa en combinación con otros tratamientos de alergia, pero no frecuentemente como tratamiento primario. Se ha utilizado exitosamente cuando es imposible evitar el alérgeno. Un tratamiento típico de desensibilización al alérgeno incorpora inyección subcutánea de alérgeno estéril en dosis crecientes una o dos veces a la semana hasta lograr una dosis que produzca un área local

pequeña transitoria de inflamación en el sitio de inyección. La dosis se administra entonces en un programa de mantenimiento una vez cada 2-4 semanas. Con mucha frecuencia la desensibilización alérgica se usa en el tratamiento de asma alérgica y rinitis alérgica, aunque ha tenido éxito en tratar anafilaxis. Del mismo modo la desensibilización se ha empleado efectivamente mediante el uso de adyuvantes, tales como adyuvante incompleto de Freund, el cual es una emulsión de antígeno acuoso en aceite mineral. El efecto fisiológico crea un depósito de líquido insoluble, del cual se liberan gradualmente gotitas de alérgeno. Otra forma de desensibilización al alérgeno es polimerizar alérgenos monoméricos con glutaraldehído para crear una molécula con alergenicidad relativamente baja (es decir, causa respuesta alérgica), conservando al mismo tiempo un grado efectivo de inmunogenicidad.

G. Presentaciones Farmacéuticas:

Las posologías y la concentración deseada del medicamento de composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la posología apropiada o vía de administración forman parte de las habilidades de un artesano corriente. Experimentos animales proporcionan una guía confiable para la determinación de dosis efectivas para terapia humana. Escalamiento interspecies de dosis efectivas puede llevarse a cabo siguiendo los principios sentados por Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi y colaboradores, Eds, Pergamon Press, New York 1989, páginas 42-46.

Cuando se emplea la administración *in vivo* de los polipéptidos o anticuerpos descritos aquí, cantidades de posología normal pueden variar de alrededor de 10 ng/kg hasta alrededor de 100 mg/kg del peso corporal del mamífero o más por día, preferiblemente alrededor de 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. En la literatura se dan guías en cuanto a las posologías y métodos particulares de administración; véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos No. 4,657,760;

5,206,344; ó 5,225,212. Se encuentra dentro del ámbito de la invención que diferentes formulaciones serán efectivas para diferentes tratamientos y diferentes trastornos, y que la administración prevista para tratar un órgano o tejido específicos puede requerir la administración en una manera diferente de la de otro órgano o tejido. Más aún, pueden administrarse posologías mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas por varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se sostiene hasta cuando ocurra una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. No obstante, pueden ser útiles otros regímenes de posología. La evolución de esta terapia se monitorea fácilmente mediante técnicas y análisis convencionales.

H. Administración de la Formulación

Las formulaciones de la presente invención, incluidas pero no limitadas a, las formulaciones reconstituidas, se administran a un mamífero necesitado de tratamiento con la proteína, preferiblemente un humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como inyección intravenosa rápida ("*a bolus*") o mediante infusión continua por un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación.

En incorporaciones preferidas, las formulaciones se administran al mamífero mediante administración subcutánea (*es decir*, debajo de la piel). Para tales propósitos, la formulación puede inyectarse usando una jeringa. Sin embargo, se encuentran disponibles otros dispositivos para administración de la formulación, tales como dispositivos de inyección (*por ej.*, los dispositivos Inject-ease™ y Genject™); plumas inyectoras (tales como la GenPen™); dispositivos auto-inyectores, dispositivos sin aguja (*por ej.*, MediJector™ y BioJector™); y sistemas de administración con parche subcutáneo.

En una incorporación específica, la presente invención se dirige a estuches para una unidad de administración de dosis única. Tales estuches

comprenden un envase de una formulación acuosa de proteína terapéutica o anticuerpo, incluyendo jeringas pre-llenadas de cámara única o múltiple. Jeringas pre-llenadas ejemplares se encuentran a disposición de Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania.

La posología apropiada ("una cantidad terapéuticamente efectiva") de la proteína dependerá, por ejemplo, de la condición que se va a tratar, la gravedad y evolución de la condición, si la proteína se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la proteína, el tipo de proteína usada, y la discreción del médico residente. La proteína se administra convenientemente al paciente de una sola vez o por una serie de tratamientos y puede administrarse al paciente en cualquier momento a partir del diagnóstico. La proteína puede administrarse como el tratamiento único o en conjunción con otros medicamentos o terapias útiles en tratar la condición en cuestión.

Donde la proteína de elección es un anticuerpo, de alrededor de 0.1-20 mg/kg es una posología candidata inicial para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas. No obstante, pueden ser útiles otros regímenes de posología. La evolución de esta terapia se monitorea fácilmente por técnicas convencionales.

Usos de una formulación anti-IgE (*por ej.*, rhuMAbE-25, rhMAbE-26, Hu-901) incluyen el tratamiento o profilaxis de enfermedades alérgicas mediadas por IgE, infecciones parasitarias, cistitis intersticial y asma, por ejemplo. Dependiendo de la enfermedad o trastorno por tratar, una cantidad terapéuticamente efectiva (*por ej.*, de alrededor de 1-15 mg/kg) del anticuerpo anti-IgE se administra al paciente.

I. Artículos de Manufactura

En otra incorporación de la invención, se provee un artículo de manufactura que contiene la formulación y, preferiblemente, ofrece instrucciones para su uso. El artículo de manufactura comprende un envase. Envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, ampollas (*por ej.*, ampollas de cámara doble), jeringas (tales como jeringas de cámara única o

doble) y tubos de prueba. El envase puede formarse de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase mantiene la formulación y la etiqueta sobre, o asociada con, el envase puede indicar instrucciones para reconstitución y/o uso. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está prevista para administración subcutánea. El envase que contiene la formulación puede ser una ampolla multi-uso, que permite administraciones repetidas (*por ej.*, de 2-6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de manufactura puede incluir además un segundo envase que comprenda un diluyente adecuado (*por ej.*, BWF1). Luego de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida será generalmente por lo menos 50 mg/ml. El artículo de manufactura puede incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos de envase con instrucciones de uso.

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. Éstos, sin embargo, no se interpretarán como limitantes del ámbito de la invención. Todas las citas de principio a fin de la divulgación se incorporan aquí expresamente por referencia.

En otra incorporación, la invención permite un artículo de manufactura que comprende las formulaciones descritas aquí para administración en un dispositivo auto-inyector. Un auto-inyector puede describirse como un dispositivo de inyección que, con la activación, entregará su contenido sin acción necesaria adicional del paciente o administrador. Son particularmente adecuados para auto-medicación de formulaciones terapéuticas, cuando la tasa de administración tiene que ser constante y el tiempo de administración es mayor que unos pocos momentos.

EJEMPLO 1

Preparación de Formulación Anti-IgE rhuMAbE25 ("E25")

Se prepararon formulaciones del anticuerpo monoclonal anti-IgE rhuMAbE25 del Lote residual a granel K9094A E25 (40 mg/ml rhuMAb

E25, 85 mM trehalosa, 5 mM histidina, pH 6, 0.01% Tween 20) o rhuMAbE25 Q-Pool (5 mg/ml rhuMAb E25, 25 mMTris, 200mMNaCl).

Se prepararon soluciones acuosas de rhuMAbE25 por diálisis en diferentes tampones (20 mM His-HCl y 200 mM Arg-HCl, pH 6.0) a 2-8°C usando una Casete de Diálisi Slide-A-Lyzer (Pierce). En seguida, las muestras se transfirieron al reservorio de muestras de microconcentradores centrífugos Centricon-30 (Amicon). Las proteínas se concentraron girando el concentrador Centricon-3 a 4000-5000 g hasta que se logró la concentración de proteína deseada.

Las muestras se concentraron entonces a ~150 mg/ml de rhuMAb E25 usando ultrafiltración. Se agregó Tween 20 a cada preparación a una concentración final de 0.02%. Todas las formulaciones se filtraron, se envasaron asépticamente en ampollas FormaVitrum de 3 cm³ y se cerraron con tapones 13-mm Diakyo en una sala Class 100.

EJEMPLO 2

Método y Materiales:

Estudios de Estabilidad: Todas las formulaciones se envasaron a 1 ml en ampollas de vidrio FormaVitrum de 3 cm³ y se cerraron con tapones 13-mm Diakyo en una secuencia de llenado estéril Class 100. Las ampollas se pusieron a -70, 2-8, 15, 30 y 40°C en envases impenetrables a la luz.

Estudio de Agitación: Alícuotas de la formulación se pusieron en las ampollas de vidrio. Las ampollas se agitaron horizontalmente en Glas-Col Bench Top Shaker a temperatura de la sala. El agitador se ajustó a 70 con una longitud de brazo de 30 cm (máximo). Luego de la agitación, las muestras se inspeccionaron y analizaron de acuerdo con el siguiente protocolo.

Estudio de Congelamiento-Descongelamiento: Muestras de E25 se sometieron a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. Cada ciclo consistía de congelamiento a -70°C de un día para otro y, posteriormente, descongelamiento a temperatura de la sala por alrededor de una hora. Luego de cada ciclo, las muestras se inspeccionaron visualmente usando una caja luminosa para evaluar el color y claridad del líquido. La turbiedad y agregados solubles se midieron siguiendo el protocolo descrito a continuación.

Métodos Analíticos: Muestras de estabilidad se analizaron por los métodos bosquejados en Tabla 1

Tabla 1: Métodos Analíticos

Análisis	Propósito
Color, Claridad, Apariencia ^a	Inspección visual de las formulaciones líquidas
Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC) ^b	Mide % de monómero, agregados solubles y componentes de bajo peso molecular
Cromatografía de Interacción Hidrófoba (HIC) ^c	Mide el nivel de isomerización Asp-32 y tiol libre
UV Spec Scan (Gravimétrico) ^f	Mide la concentración de la proteína
Turbiedad (OD medio 340-360 nm) ^d	Mide los agregados solubles e insolubles
Actividad ^e	Determina la actividad de unión de anti-IgE

^a Aceptación de Color, Apariencia y Claridad:

El color, apariencia y claridad de la muestra se evaluaron visualmente contra

el fondo blanco y negro de la inspección y se compararon con un volumen igual de control negativo. Las muestras deben centrifugarse cuidadosamente para garantizar una mezcla homogénea, pero no tan vigorosamente como para crear burbujas de aire.

^b Cromatografía de Exclusión de Tamaño:

Se utilizó una columna TSK SUPER SW3000 (4.6 x 300 mm) en un sistema de cromatografía HP 1100. La columna se cargó con 20 µg de proteína y se eluyó en 0.1 M de fosfato de potasio, pH 6.8. La muestra se midió a 280 nm por un detector UV.

^c Cromatografía de Interacción Hidrófoba (HIC):

Los experimentos HIC se llevaron a cabo usando una columna TSK Phenyl-5PW (7.5 x 75 mm) (TosoHaas) en un sistema de cromatografía líquida HP 1100. La columna se cargó con 28 µg de fragmentos Fab digeridos con papaína y se eluyó con una gradiente de concentración de sulfato de amonio en tampón 20 mM Tris de 2 M a 0 M. Los picos se monitorearon a 210 nm por un detector UV.

^d Turbiedad:

La turbiedad de las muestras se determinó en una cubeta de longitud de paso de 1 cm usando un espectrómetro HP. La turbiedad se calculó como la absorbencia promedio de 340-360 nm.

^e La actividad del anticuerpo monoclonal anti-IgE se determinó por un análisis de inhibición de unión a receptor. Las muestras se diluyeron para estar en el margen de la curva estándar de 100 y 1.56 µg/ml en un diluyente de análisis que contenía tampón de fosfato, 0.5% BSA, 0.05% polisorbato 20, 0.01% thimerosol. Una placa de microconcentración se recubrió con receptor IgE, luego se incubó con la IgE-biotina y se diluyó la muestra anti-IgE. La cantidad de IgE-biotina unida al receptor que se correlacionó con actividad de anticuerpo monoclonal anti-IgE se midió usando

estreptavidina-HRP. Los datos se analizaron usando un programa de ajuste de curva logística de 4 parámetros.

^f La concentración de anticuerpo se obtuvo en un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett Packard 8453 con un cubetero de cuarzo de 1cm. La concentración se calculó usando una capacidad de absorción de 1.5 cm⁻¹ (mg/ml).⁻¹

Sumario de Formulaciones Líquidas

Formulaciones	Márgenes de Proteína	Tampón/Márgenes	Excipientes/Márgenes
80 mg/ml E25 50 mM Histidina-HCl 150 mM Trehalosa 0.05% Polisorbato 20 pH6.0	40-150 mg/ml	Márgenes His-HCl ó His- Acetato: 10 mM - 100 mM	Márgenes de Azúcar Trehalosa o Sacarosa: 20 mM -350 mM Polisorbato: 0.01%- 0.1%
150 mg/ml E25 20 mM Histidina-HCl 200 mM ArgHCl 0.02% Polisorbato 20 pH 6.0	40-260 mg/ml	Márgenes His-HCl o His Acetato: 10 mM - 100 mM	Márgenes ArgHCl: 50 mM -200 mM Polisorbato: 0.01%- 0.1%

Datos de Estabilidad para 150 mg/ml E25 en Formulación Histidina ArgHCl

Temp. (°C)	Tiempo (meses)	Visual	PH	SEC ^a % Monómero	HIC ^b % de Ppal	Potencia ^c	Turbiedad ^d
5	0	Acept.	6.2	99.0	64	106	0.25
	1	Acept.	6.0	99.2	63	100	0.27
	3	Acept.	6.0	99.3	63	111	0.25
	16	Acept.	6.0	98.9	62	83	0.27
30	1	Acept.	5.9	98.43 97.53	54	91	0.25
	3	Acept.	6.1	90.63	42	65	0.30
	16	Acept.	6.0		19	28	0.54

Datos de Estabilidad para 80 mg/ml E25 en Formulación de Histidina y Trehalosa

Temp. (°C)	Tiempo (meses)	Visual	PH	SEC ^a % Monómero	HIC ^b % Ppal	Potencia ^c	Turbiedad ^d
5	0	Acept.	5.7	99.1	64	100	0.20
	1	Acept.	5.8	98.7	63	92	0.20
	3	Acept.	5.7	98.8	63	124	0.20
	6	Acept.	5.7	99.1	63	97	0.21
	14	Acept.	5.7	99.0	62	83	0.21
	24	Acept.	5.7	98.8	62	84	0.20
30	1	Acept.	5.8	98.7	55	77	0.20
	3	Acept.	5.7	97.4	41	76	0.29
	6	Acept.	5.8	95.5	31	48	0.38
	14	Acept.	5.7	93.1	22	30	0.48

- a. Cromatografía de exclusión de tamaño para medir agregados solubles y fragmentos
- b. Cromatografía de interacción hidrófoba para E25 digerida con papaína.
- c. Análisis de inhibición de unión de receptor IgE
- d. OD medio (340-360 nm)

Estudio de Agitación:

Formulación	T0			Agitación luego de 3 días		
	Visual	SEC (% Monómero)	Turbiedad	Visual	SEC (% Monómero)	Turbiedad
1	Acept.	99.5	0.18	Acept.	99.3	0.18
2	Acept.	99.0	0.19	Acept.	99.4	0.19

Formulación 1: 156 mg/ml E25, 200 mM ArgCl, 23 mM His, 0.02 % T20

Formulación 2: 150 mg/ml E25, 182 mM ArgCl, 20 mM His, 0.02 % T20

Estudio Congelamiento-Descongelamiento:

Formulación	T0			Luego del 1º Ciclo			Luego del 3º Ciclo		
	Visual	SEC % Monómero	Turbiedad	Visual	SEC % Monómero	Turbiedad	Visual	SEC % Monómero	Turbiedad
1	Acept.	99.5	0.18	Acept.	99.3	0.17	Acept.	99.4	0.17
2	Acept.	99.0	0.19	Acept.	99.2	0.19	Acept.	99.2	0.18

Formulación 1: 156 mg/ml E25, 200 mM ArgCl, 23 mM His, 0.02 % T20

Formulación 2: 150 mg/ml E25, 182 mM ArgCl, 20 mM His, 0.02 % T20

EJEMPLO 3

Muestras de las formulaciones líquidas de anticuerpo monoclonal anti-IgE (E26) se prepararon e tampones 20 mM y luego se almacenaron a 30°C y 40 °C. La estabilidad de E26 se determinó por cromatografía y mediciones de actividad. La cromatografía de exclusión de tamaño se usó para determinar los agregados solubles, y la cromatografía de interacción hidrófoba de la muestra digerida con pepsina se usó para medir la isomerización. La actividad de la muestra se monitoreó usando un análisis de inhibición de la unión del receptor IgE. Como se muestra en Figura 1, 2 y 3, la degradación de E26 es altamente dependiente del pH de los tampones. El E26 parece ser muy estable al rededor de pH 6.0.

EJEMPLO 4

La formulación de particulado es uno de los retos principales en la elaboración de una formulación líquida de alta concentración, ya que éste aumenta habitualmente con el incremento de la concentración de proteína bajo las condiciones acentuadas. Figura 4 muestra el resultado del estudio de

agitación para un formulación líquida de E26 concentrado. La formulación se preparó en 20 mM succinato, 192 mM trehalosa a pH 6.0 con diferente concentración de polisorbato 20. La formulación de particulado se monitoreó por medición de la turbiedad. El resultado muestra que la turbiedad de la solución de E26 aumenta con el tiempo de agitación. La adición de por lo menos 0.01% de polisorbato es esencial para reducir la formulación de particulado bajo la condición acentuada. Se observaron también resultados similares para la formulación líquida de E25 concentrado.

EJEMPLO 5

Figura 5 muestra la formulación líquida de 150 mg/ml E25 preparado por reconstitución de E25 liofilizado. El incremento de la concentración de sal inhibe la formación de particulado reversible y resulta en la reducción de la lectura de turbiedad. Entre todas las sales analizadas, la formulación con Arg-HCl parece tener la turbiedad mínima. El efecto de la concentración de la sal en disminuir la lectura de la turbiedad se había observado igualmente para E25 preparado usando un proceso TFF.

EJEMPLO 6

La formulación líquida de E25 en la presencia de ArgHCl parece tener asimismo una mejor estabilidad que otras formulaciones líquidas. Figura 6 y 7 muestran el estudio de estabilidad de E25 a 150 mg/ml en formulaciones líquidas que contienen ArgHCl, CaCl_2 y MgCl_2 . Para la formulación líquida que contiene ArgHCl con o sin sacarosa, hay poca diferencia en su estabilidad en términos de turbiedad, isomerización y fragmentación. Las formulaciones líquidas que contienen ArgHCl son más estables que la formulación que contiene MgCl_2 y CaCl_2 .

EJEMPLO 7

Figura 8 muestra los resultados de un estudio de estabilidad de formulación líquida de E25 con formulaciones de acetato e histidina. La formulación con histidina tiene un pH mayor que la formulación de acetato. Los resultados mostraron claramente que los E25 en una formulación líquida de histidina, ArgHCl son más estables que bajo otras condiciones.

EJEMPLO 8

La alta concentración de E25 puede formar un gel sólido en la presencia de ciertos iones, tales como citrato, succinato y sulfato (Tabla I), particularmente a una temperatura de almacenamiento de 2-8 °C. Usar HCl de arginina como un excipiente nos permite formular E25 hasta más de 200 mg/ml sin gel o formación de precipitado.

**Tabla 1: Efecto de varios excipientes sobre la congelación de E25 a
125 mg/ml, pH
~6.0**

Excipiente	Concentración del Excipiente MM	Preparación	Turbiedad a T0 (340-360 nm)	Concentración Anticuerpo mg/ml	Apariencia Visual
SWFI		Lio Recon	0.21	125	Clara
NaCl	188	Lio Recon	0.25	125	Clara
Succinato	94	Lio Recon	0.31	125	Gel
Succinato	19	Lio Recon	0.28	125	Gel
Citrato	188	Lio Recon	Pendiente	125	Gel
Citrato	19	Lio Recon	Pendiente	125	Gel
Na ₂ SO ₄	Pendiente	Lio Recon	Pendiente	125	Gel
Na ₂ SO ₄	Pendiente	Lio Recon	Pendiente	125	Opalescente
Fosfato	Pendiente	Lio Recon	Pendiente	125	Opalescente
Acetato	188	Lio Recon	Pendiente	125	Clara
Acetato	94	Lio Recon	Pendiente	125	Clara
Acetato	19	Lio Recon	Pendiente	125	Clara
Histidina	94	Lio Recon	0.19	125	Clara
Histidina	47	Lio Recon	0.24	125	Clara
Arginina- HCl	150	Lio Recon	0.25	137	Clara
Arginina- HCl	200	TFF	0.19	162	Clara
Arginina- SO ₄	150	Lio Recon	0.27	137	Gel
CaCl ₂	125	TFF	0.32	147	Clara
MgCl ₂	125	TFF	0.48	147	Opalescente

EJEMPLO 9

Expresión de proteína o anticuerpo en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de una proteína o anticuerpo deseados por expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica la proteína o anticuerpo deseados se amplifica inicialmente usando cebadores PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzima de restricción que correspondan a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado. Puede emplearse una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector apropiado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar y colaboradores, *Gene*, 2:95 (1977)), que contiene genes para resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Las secuencias amplificadas con PCR se ligan entonces en el vector. El vector incluirá preferiblemente secuencias que codifican para un gen de resistencia a los antibióticos, un promotor trp, un líder polyhis (incluidos los primeros seis codones STII, secuencia polyhis, y sitio de segmentación de enterocinasa), la región codificadora de la proteína o anticuerpo deseados, terminado de transcripción lambda, y un gen argU. Adicionalmente, el vector puede incluir por lo menos porciones no insignificantes de las secciones 5' y 3' no traducidas del ácido nucleico de secuencia nativa que codifica la proteína o anticuerpo deseados.

La mezcla de ligación se emplea entonces para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada usando los métodos descritos en Sambrook y colaboradores, más arriba. Los transformantes se identifican por su capacidad de crecer en placas LB, y a continuación se seleccionan colonias resistentes a los antibióticos. El ADN plásmido puede aislarse y confirmarse por análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Clones seleccionados pueden cultivarse de un día para otro en medio de cultivo líquido tal como caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de un día para otro puede usarse posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. Las células se cultivan entonces a una densidad

óptica deseada, por la cual el promotor de expresión se activa.

Luego de cultivar las células por varias horas más, las células pueden recogerse mediante centrifugación. La mini-esfera de células obtenida por la centrifugación puede solubilizarse usando varios agentes conocidos en el arte, y la proteína o anticuerpo solubilizados deseados pueden purificarse entonces usando una columna quelante de metal bajo condiciones que permiten una unión estrecha de la proteína o anticuerpo solubilizados.

La proteína o anticuerpo deseados pueden expresarse en *E. coli* en una forma etiquetada con poly-His, usando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica la proteína o anticuerpo deseados se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzima de restricción que corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que permiten una iniciación de traducción eficiente y confiable, purificación rápida en una columna de quelación de metal, y eliminación proteolítica con enterocinasa. Las secuencias amplificadas con PCR, etiquetadas con poly-His se ligan entonces en un vector de expresión, el cual se usa para transformar un huésped *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes se cultivan primero en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30EC con agitación hasta que se alcance un O.D.600 de 3-5. A continuación los cultivos se diluyen 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3.57 g (NH₄)₂SO₄, 0.71 g de citrato de sodio 2H₂O, 1.07 g KCl, 5.36 g de extracto de levadura Difco, 5.36 g Sheffield hycase SF en 500 mL agua, así como 110 mM MPOS, pH 7.3, 0.55% (p/v) glucosa y 7 mM MgSO₄) y se cultivaron por aproximadamente 20-30 horas a 30EC con agitación. Las muestras se retiran para verificar la expresión por análisis SDS-PAGE, y el grueso del cultivo se centrifugó para peletizar las células. Las microesferas de células se congelan hasta la purificación y el replegamiento.

Pasta de *E. coli* de fermentaciones 0.5 a 1 L (microesferas de 6-10 g) se re-suspende en 10 volúmenes (p/v) en 7 M guanidina, 20 mM Tris, tampón pH 8. Se agregan sulfito de sodio sólido y tetracionato de sodio para preparar

concentraciones finales de 0.1 M y 0.02 M, respectivamente, y la solución se agita de un día para otro a 4EC. Este paso resulta en una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por sulfitación. La solución se centrifuga a 40,000 rpm en una Ultracentrífuga Beckman por 30 minutos. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna de quelado de metal (6 M guanidina, 20 mM Tris, pH 7.4) y se filtra a través de filtros de 0.22 micrones para clarificarla. El extracto clarificado se carga en una columna de quelado de 5 ml Qiagen Ni-NTA equilibrada en el tampón de columna de quelado de metal. La columna se lava con tampón adicional que contiene 50 mM de imidazol (Calbiochem, grado Utrol), pH 7.4. La proteína se eluye con tampón que contiene 250 mM imidazol. Fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y se almacenan a 4EC. La concentración de proteína se estima por su absorbencia a 280 nm usando el coeficiente de extinción calculada, basada en su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas se repliegan diluyendo la muestra lentamente en tampón de replegamiento recién preparado compuesto de: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M urea, 5 mM cisteína, 20 mM glicina y 1 mM EDTA. Se eligen volúmenes de replegamiento, de modo que la concentración final de proteína esté entre 50 a 100 microgramos/ml. La solución de replegamiento se agita suavemente a 4EC por 12-36 horas. La reacción de replegamiento se atempera con la adición de TFA a una concentración final de 0.4% (pH de aproximadamente 3). Antes de una posterior purificación de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0.22 micrones y se añade acetonitrilo a una concentración final de 2-10%. La proteína replegada se cromatografía en una columna de fase reversa Poros R1/H usando un tampón móvil de 0.1% TFA con elución con una gradiente de acetonitrilo de 10 a 80%. Alícuotas de fracciones con absorbencia A280 se analizan en geles de poliacrilamida SDS y se agrupan fracciones que contengan proteína replegada homogénea. Generalmente, la especie apropiadamente replegada de la mayoría de las proteínas se eluyen con las concentraciones mínimas de acetonitrilo, ya que esas especies son las más compactas, sin sus interiores hidrófobos

protegidos de la interacción con la resina de fase reversa. Usualmente las especies agregadas se eluyen con concentraciones más elevadas de acetonitrilo. Además de separar las formas mal plegadas de proteínas de la forma deseada, el paso de fase reversa retira también endotoxina de las muestras.

Fracciones que contienen la proteína o anticuerpo deseados replegados se agrupan, y se retira el acetonitrilo usando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en 20 mM Hepes, pH 6.8 con 0.14 M de cloruro de sodio y 4% manitol mediante diálisis o filtración en gel usando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y se filtran esterilizadamente.

EJEMPLO 10

Expresión de proteína o anticuerpo en células mamíferas

Este ejemplo ilustra la preparación de formas potencialmente glicosiladas de la proteína o anticuerpo deseados por expresión recombinante en células mamíferas.

El vector, pRK5 (véase EP 307, 247, publicada el 15 de marzo de 1989), se emplea como el vector de expresión. Opcionalmente, ADN que codifica la proteína o anticuerpo deseados se liga en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la de tal ADN usando métodos de ligación tales como los descritos en Sambrook y *colaboradores*, más arriba.

En una incorporación, las células huéspedes seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se cultivan a confluencia en placas de cultivo de tejido en un medio tal como DMEM suplementado con suero fetal bovino y, opcionalmente, componentes nutrientes y/o antibióticos. Alrededor de 10 µg de ADN que codifica la proteína o anticuerpo deseados, ligados en pRK5, se mezclan con alrededor de 1 µg de ADN que codifica el gen ARN VA [Thimmappaya y *colaboradores*, *Cell*, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl₂. A esta mezcla se agrega, gota a

gota, 500 μ l de 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO_4 , y se deja formar un precipitado por 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se agrega a las células 293 y se deja sedimentar por alrededor de cuatro horas a 37°C. Se aspira el medio de cultivo y se agregan 2 ml de glicerina al 20% en PBS por 30 segundos. Las células 293 se lavan entonces con medio libre de suero, se añade medio fresco y las células se incuban por alrededor de 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se retira y reemplaza con medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -cisteína y 200 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -metionina. Luego de 12 horas de incubación, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de espín, y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a película por un período seleccionado de tiempo para revelar la presencia de la proteína o anticuerpo deseados. Los cultivos que contienen células transfectadas puede someterse a posterior incubación (en medio libre de suero) y el medio se prueba en bioanálisis seleccionados.

En una técnica alternativa, la proteína o anticuerpo deseado pueden introducirse en células 293 transitoriamente usando el método de sulfato de dextrano descrito por Somparyrac y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). Células 293 se cultivan a densidad máxima en un matraz giratorio y se agregan 700 μg de ADN que codifica la proteína o anticuerpo deseados, ligados en pRK5. Las células se concentran primero del matraz giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado ADN-dextrano se incuba en la microesfera de células por cuatro horas. Las células se tratan con glicerina al 20% por 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se re-introducen en el matraz giratorio que contiene medio de cultivo de tejido, 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina bovina y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina bovina. Después de alrededor de cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para retirar células y desechos. La muestra que contiene la proteína o anticuerpo expresados deseados puede concentrarse y purificarse entonces por cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía de columna.

En otra incorporación, la proteína o anticuerpo deseados pueden expresarse en células CHO. El ADN que codifica la proteína o anticuerpo deseados, ligados en pRK5, puede transfectarse en células CHO usando reactivos conocidos tales como CaPO_4 ó DEAE-dextrano. Como se describe más arriba, los cultivos de células pueden incubarse, y reemplazarse el medio con medio de cultivo (solo) o medio que contenga un radiomarcador tal como ^{35}S -metionina. Luego de determinar la presencia de la proteína o anticuerpo deseados, el medio de cultivo puede reemplazarse con medio libre de suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban por alrededor de 6 días, y luego se recoge el medio acondicionado. El medio que contienen la proteína o anticuerpo deseados expresados puede concentrarse y purificarse entonces por cualquier método seleccionado.

Variantes marcadas con epítipo de la proteína o anticuerpo deseados pueden expresarse igualmente en células CHO. El ADN que codifica la proteína o anticuerpo deseados, ligados en pRK5, puede subclonarse del vector pRK5. El inserto del subclon puede someterse a PCR para fusionar sin cambio en la fase de lectura, con una marca de epítipo seleccionado, tal como una etiqueta poly-his en un vector de expresión de Baculovirus. El ADN etiquetado con poly-his que codifica el inserto de la proteína o anticuerpo deseados puede entonces subclonarse en un vector inducido por SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para selección de clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (como se describe anteriormente) con el vector inducido por SV40. La marcación puede realizarse, como ya se describió, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene la proteína o anticuerpo deseados expresados, etiquetados con poly-His, puede entonces concentrarse y purificarse por cualquier método seleccionado, tal como por cromatografía de afinidad con quelado Ni^{2+} .

La proteína o anticuerpo deseados puede expresarse también en células CHO y/o COS por un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO por otro procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO se lleva a cabo usando el

siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como constructo de IgG (inmunoadhesina), en el cual las secuencias codificadoras para las formas solubles (*por ej.*, dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de región constante IgG1 que contiene la unión flexible, los dominios CH2 y CH2 y/o es una forma etiquetada con poly-His.

Luego de la amplificación PCR, los ADNs respectivos se subclonan en un factor de expresión CHO usando técnicas estándar como se describe en Ausubel y colaboradores, *Current Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión CHO se construyen para que tengan sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés para permitir el lanzamiento/transporte conveniente ("*convenient shuttling*") de cADN=s. El vector usó expresión en células CHO como se describe en Lucas y colaboradores, *Nucl. Acids Res.* 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el intensificador/promotor temprano SV40 para guiar la expresión del cADN de interés y dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para mantenimiento estable del plásmido luego de la transfección.

Doce microgramos del ADN plásmido deseado se introducen en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección disponibles en el comercio Superfect⁷ (Quiagen), Dosper⁷ o Fugene⁷ (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas y colaboradores, más arriba. Aproximadamente 3×10^7 células se congelan en una ampollita para crecimiento y producción posterior como se describe a continuación.

Las ampollitas que contienen el ADN plásmido se descongelan poniéndolas en baño maría y se mezclan por efecto remolino. Los contenidos se dosifican con pipeta en un tubo de centrifugación que contiene 10 mLs de medio y se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se re-suspenden en 10 mL de medio selectivo (PS20 filtrado 0.2 Φ m con suero bovino fetal al 5% diafiltrado 0.2 Φ m). Las células se reparten entonces en alícuotas en una centrifugadora ("*spinner*") de 100 mL que contiene 90 mL de medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se

transfieren en una centrifugadora de 250 mL llenada con 150 mL de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37°C. Luego de otros 2-3 días, se siembran centrifugadoras de 250 mL, 500 mL y 2000 mL con 3×10^5 células/mL. Se cambia el medio de las células con medio fresco por centrifugación y re-suspensión en medio de producción. Aunque puede emplearse cualquier medio CHO apropiado, de hecho puede utilizarse un medio de producción descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,122,469, expedida el 16 de junio de 1992. Un centrifugadora de producción de 3L se siembra con 1.2×10^6 células/mL. El día 0, se determina el número de células y el pH. El día 1, se extraen muestras de la centrifugadora y se inicia la aspersión con aire filtrado. El día 2, se extraen muestras de la centrifugadora, se cambia la temperatura a 33°C, y se toman 30 mL de 500 g/L glucosa y 0.6 mL de 10% anti-espumante (*por ej.*, emulsión de poliidimetilsiloxana al 35%, Emulsión Grado Médico Dow Corning 365). De principio a fin de la producción, se ajusta el pH según sea necesario para mantenerlo alrededor de 7.2. Después de 10, o hasta que la viabilidad cayera por debajo de 70%, se recoge el cultivo de células por centrifugación y filtración a través de un filtro 0.22 Φ m. El filtrado se almacenó a 4°C o se cargó inmediatamente en columnas para purificación.

Para los constructos etiquetados con poly-His, las proteínas se purifican usando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se agrega imidazol al medio acondicionado a una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea a una columna Ni-NTA de 6 ml equilibrada a 4°C, en 20 mM Hepes, pH 7.4, tampón que contiene 0.3 M NaCl y 5 mM imidazol a una rata de flujo de 4-5 ml/minuto. Luego de cargarla, la columna se lava con más tampón de equilibrio y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene 0.25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desaliniza posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl y 4% manitol, pH 6.8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se almacena a -80°C.

Constructos de inmunoadesina (que contiene Fc) se purifican del medio acondicionado en la siguiente forma. El medio acondicionado se

bombee a una columna Proteína A (Pharmacia) de 5 ml, que se ha equilibrado en 20 mM de tampón de fosfato de sodio, pH 6.8. Luego de cargarla, la columna se lava extensivamente con tampón de equilibrio antes de la elución con 100 mM de ácido cítrico, pH 3.5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recolectando fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 Φ L de 1 M de tampón Tris, pH 9. La proteína altamente purificada se desaliniza seguidamente en tampón de almacenamiento como se describe más arriba para las proteínas etiquetadas con poly-His. Se evalúa la homogeneidad mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciamiento de aminoácido N-terminal por degradación de Edman.

EJEMPLO 11

Expresión de proteínas o anticuerpos en levadura

El siguiente método describe la expresión recombinante de la proteína o anticuerpo deseados en levadura.

Primeramente, se construyen vectores de expresión de levadura para la producción o secreción intracelular de la proteína o anticuerpo deseados a partir del promotor ADH2/GAPDH. ADN que codifica la proteína o anticuerpo deseados y el promotor se insertan en sitios apropiados de enzima de restricción en el plásmido seleccionado, con el fin de dirigir la expresión intracelular. Para la secreción, el ADN que codifica la proteína o anticuerpo deseados puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido de señal nativo u otro péptido de señal mamífero, o, por ejemplo, un factor alfa de levadura o secuencia líder/señal secretora de invertasa, y secuencias enlazantes (si es necesario) para expresión de la proteína o anticuerpo deseados.

Células de levadura, tales como cepa de levadura AB110, pueden transformarse entonces con los plásmidos de expresión descritos más arriba y cultivados en medio seleccionado de fermentación. Los sobrenadantes de levadura transformada pueden analizarse por precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación por SDS-PAGE, seguido por tinción de los geles con tintura Coomassie Blue.

La proteína o anticuerpo recombinantes pueden aislarse posteriormente y purificarse retirando las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y luego concentrando el medio usando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contiene la proteína o anticuerpo recombinante puede purificarse aún más usando resinas seleccionadas de cromatografía de columna.

EJEMPLO 12

Expresión de la Proteína o anticuerpo en Células de Insecto Infectadas con Baculovirus

El siguiente método describe la expresión recombinante de la proteína o anticuerpo en células de insecto infectadas con Baculovirus.

La secuencia que codifica para la proteína o anticuerpo deseados se fusiona corriente arriba de una marca de epítipo contenida en un vector de expresión de baculovirus. Tales etiquetas de epítipo incluyen etiquetas poly-his y etiquetas de inmunoglobulina (como regiones Fc de IgG). Puede emplearse una variedad de plásmidos, incluidos plásmidos derivados de plásmidos disponibles en el comercio, tales como pVL1393 (Novagen). Concretamente, la secuencia que codifica la porción deseada de la proteína o anticuerpo, tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína de transmembrana o las secuencias que codifican la proteína madura, si la proteína extracelular se amplifica por PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios flanqueantes (seleccionados) de enzima de restricción. El producto se digiere luego con aquellas enzimas seleccionadas de restricción y se subclona en el vector de expresión.

Baculovirus recombinante se genera por co-transfección del plásmido anterior y ADN de virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando lipofectina (obtenible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se emplean para amplificaciones posteriores. La infección vírica y la expresión de proteínas

se llevan a cabo como se describe por O'Reilley y colaboradores, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

La proteína o anticuerpo etiquetados con poly-his, expresados, pueden purificarse entonces, por ejemplo, por cromatografía de afinidad de quelado Ni^{2+} en la siguiente forma. Los extractos se preparan de células Sf9 infectadas con virus recombinante como se describe por Rupert y colaboradores, *Nature*, 362:175-179 (1993). Concretamente, células Sf9 se lavan, se re-suspenden en tampón de sonicación (25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl_2 ; 0.1 mM EDTA; glicerina 10%; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), y se sonicán dos veces por 20 segundos en hielo. Se depuran los sonicados por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de carga (50 mM fosfato, 300 mM NaCl, glicerina 10%, pH 7.8) y se filtran a través de un filtro 0.45 Φm . Se prepara una columna de Ni^{2+} -NTA agarosa (disponible comercialmente de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 mL, se lava con 25 mL de agua y se equilibra con 25 mL de tampón de carga. El extracto de células filtradas se carga en la columna a 0.5 mL por minuto. La columna se lava al valor de referencia A_{280} con tampón de carga, punto en el cual se inicia la recolección de fracciones. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM fosfato; 300 mM NaCl, glicerina 10%, pH 6.0), que eluye proteína ligada no específicamente. Luego de alcanzar nuevamente el valor de referencia A_{280} , la columna se desarrolla con un gradiente 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de 1 mL y se analizan por SDS-PAGE y tinción con plata o Western con Ni^{2+} -NTA-conjugada a fosfatasa alcalina (Qiagen): Fracciones que contienen la proteína o anticuerpo marcados con His_{10} , eluidos, se agrupan y dializan contra el tampón de carga.

Alternativamente, la purificación de la proteína o anticuerpo marcada con IgG (o marcada con Fc) puede llevarse a cabo usando técnicas de cromatografía conocidas, incluidas por ejemplo, cromatografía de columna de proteína A o proteína G.

EJEMPLO 13

Preparación de Anticuerpos

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden fijar específicamente la proteína de interés del antígeno deseado.

Técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en el arte y se describen, por ejemplo, en Goding, más arriba. Inmunógenos que pueden emplearse incluyen la proteína deseada purificada o anticuerpo diana, proteínas de fusión que contienen la proteína deseada o antígeno diana, y células que expresan dicha proteína recombinante o antígeno en la superficie de la célula. La selección del inmunógeno puede hacerse por el artesano experimentado sin experimentación excesiva.

Ratones, tales como Balb/c, se inmunizan con la proteína deseada o inmunógeno antígeno diana, emulsionado en adyuvante completo de Freund, y se inyectan subcutánea o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en los cojincillos de las patas traseras del animal. Los ratones inmunizados se revacunan (reciben una inyección de refuerzo) entonces 10 a 12 días más tarde con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Más tarde, por varias semanas, los ratones pueden revacunarse con inyecciones adicionales de inmunización. Pueden obtenerse periódicamente muestras de suero de los ratones mediante sangrado retro-orbital para pruebas en análisis ELISA para detectar anticuerpos dirigidos a la proteína deseada o antígeno.

Una vez detectada una concentración apropiada de anticuerpos, los animales "positivos" para anticuerpos pueden inyectarse con una inyección intravenosa final de la proteína deseada o antígeno diana. Tres o cuatro días después, los ratones se sacrifican y se recogen las células del vaso. Las células del vaso se fusionan entonces (usando 35% de polietilen glicol) a una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como B3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma, las cuales pueden repartirse en placas de cultivo de tejido de 96

pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células del bazo.

Las células de hibridoma se cribarán en un ELISA con respecto a la reactividad contra la proteína deseada o antígeno diana. La determinación de células de hibridoma "positivas" que segreguen los tales anticuerpos monoclonales se encuentra dentro de las habilidades en el arte.

Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones Balb/c singénicos para producir ascitis que contengan tales anticuerpos monoclonales. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse en matraces de cultivo de tejido o frascos/tubos de cultivo ("*roller bottles*"). La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en las ascitis puede llevarse a cabo usando precipitación de sulfato de amonio, seguida por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede emplearse cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

EJEMPLO 14

Purificación de la Proteína Deseada Usando Anticuerpos Específicos

La proteína deseada, en cualquiera de sus formas, recombinante o nativa, puede purificarse por una variedad de técnicas estándar en el arte de purificación de proteínas. Por ejemplo, formas de pro-polipéptido, polipéptido maduro, o pre-polipéptido de la proteína deseada pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para la proteína deseada. En general, se construye una columna de inmunoafinidad acoplando covalentemente el anticuerpo que específicamente fija la proteína deseada a una resina cromatográfica activada.

Inmunoglobulinas policlonales se preparan de sueros inmunes, ya sea por precipitación con sulfato de amonio o ya sea por purificación en Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Análogamente, se preparan anticuerpos monoclonales de fluido de ascitis de

ratón por precipitación de sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. Inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea, y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tal columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación de la proteína deseada preparando una fracción de células que la expresan en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de la célula entera o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial por la adición de un detergente o por otros métodos bien conocidos en el arte. Alternativamente, proteína soluble, que contiene una secuencia de señal, puede segregarse en cantidad útil en el medio, en el cual se cultivan las células.

La preparación solubilizada que contiene la proteína deseada se pasa por la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava bajo condiciones que permiten la absorberencia preferencial de la proteína deseada (*por ej.*, tampones de alta concentración iónica en la presencia de un detergente). En seguida, la columna se eluye bajo condiciones que alteran la unión de anticuerpo a proteína (*por ej.*, un tampón de pH bajo, tal como aproximadamente pH 2-3, o una concentración alta de un desestabilizador de proteínas ("*chaotrope*"), tal como urea o ión de tiocianato), y entonces se recoge la proteína deseada.

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Una formulación líquida estable, de baja turbiedad, que comprende (a) una proteína o anticuerpo en una cantidad de 100 a 260 mg/ml, (b) HCl de arginina en una cantidad de 50 a 200 mM, (c) histidina en una cantidad de 10 a 100 mM, (d) polisorbato en una cantidad de 0.01 a 0.1%, donde la formulación tiene además un pH que varía de 5.5 a 7.0, una viscosidad cinemática de alrededor de 50 cs ó menos y una osmolaridad que varía de 200 mOsm/kg a 450 mOsm/kg.

2. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de proteína o anticuerpo varía de 120 mg/ml a 260 mg/ml.

3. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de proteína o anticuerpo varía de 150 mg/ml a 260 mg/ml.

4. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de proteína o anticuerpo varía de 180 mg/ml a 260 mg/ml.

5. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de proteína o anticuerpo varía de 200 mg/ml a 260 mg/ml.

6. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de proteína o anticuerpo es de alrededor de 150 mg/ml.

7. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la osmolaridad varía de 250 mOsm/kg a 350 mOsm/kg.

8. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de HCl de arginina varía de 100 mg/ml a 200 mg/ml.

9. Una formulación líquida estable, de baja turbiedad, que

comprende (a) un anticuerpo monoclonal anti-IgE en una cantidad de 100 a 260 mg/ml, (b) HCl de arginina en una cantidad de 50 a 200 mM, (c) histidina en una cantidad de 10 a 100 mM, (d) polisorbato en una cantidad de 0.01 a 0.1%, donde la formulación tiene además un pH que varía de 5.5 a 7.0, una viscosidad cinemática de alrededor de 50 cs ó menos y una osmolaridad que varía de 200 mOsm/kg a 450 mOsm/kg.

10. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de proteína o anticuerpo varía de 120 mg/ml a 260 mg/ml.

11. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de proteína o anticuerpo varía de 150 mg/ml a 260 mg/ml.

12. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de proteína o anticuerpo varía de 180 mg/ml a 260 mg/ml.

13. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de proteína o anticuerpo varía de 200 mg/ml a 260 mg/ml.

14. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la concentración de proteína o anticuerpo es de alrededor de 150 mg/ml.

15. La formulación de la Reivindicación 1, en donde la osmolaridad varía de 250 mOsm/kg a 350 mOsm/kg.

16. La formulación de la Reivindicación 1, donde el anticuerpo anti-IgE se selecciona del grupo conformado por rhuMAbE25, rhuMAbE26 y Hu-901.

17. La formulación de la Reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-IgE es rhuMAbE25.

18. La formulación de la Reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-IgE es rhuMAbE26.

19. La formulación de la Reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-IgE es Hu-901.

20. Una formulación líquida estable, de baja turbiedad, que comprende (a) un anticuerpo anti-IgE en una cantidad de alrededor de 150 mg/ml, (b) HCl de arginina en una cantidad de 200 mM, (c) histidina en una cantidad de 20 mM, (d) polisorbato en una cantidad de 0.02%, donde la formulación tiene además un pH de 6.0.

21. La formulación de la Reivindicación 20, en donde el anticuerpo anti-IgE es E25.

22. Un artículo de manufactura que comprende un envase que encierra la formulación de la Reivindicación 1.

23. El artículo de manufactura de la Reivindicación 22, en donde el envase es una jeringa.

24. El artículo de manufactura de la Reivindicación 23, en donde la jeringa está además contenida en un dispositivo de inyección.

25. El artículo de manufactura de la Reivindicación 24, en donde el dispositivo de inyección es un auto-inyector.

26. La formulación de la Reivindicación 1, en donde dicha formulación se reconstituye.

27. La formulación de la Reivindicación 26, en donde la concentración de proteína o anticuerpo en dicha formulación reconstituida es

alrededor de 2-40 veces mayor que la concentración antes de la liofilización.

28. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE, que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20.

29. El método de la Reivindicación 28, en donde el trastorno mediado por IgE se selecciona del grupo conformado por rinitis alérgica, asma, asma alérgica, asma no alérgica, dermatitis atópica y gastroenteropatía.

30. El método de la Reivindicación 28, en donde el trastorno mediado por IgE es rinitis alérgica.

31. El método de la Reivindicación 28, en donde el trastorno mediado por IgE es asma alérgica.

32. El método de la Reivindicación 28, en donde el trastorno mediado por IgE es asma.

33. El método de la Reivindicación 28, en donde el trastorno mediado por IgE es dermatitis atópica.

34. El método de la Reivindicación 28, en donde el trastorno mediado por IgE se selecciona del grupo conformado por hipersensibilidad, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasitarias, cistitis intersticial, síndrome hiper-IgE, ataxia-telangiectasia, Síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoplasia tímica, mieloma IgE y reacción injerto-versus-huésped.

35. El método de la Reivindicación 28 en donde el trastorno mediado por IgE es hipersensibilidad.

36. El método de la Reivindicación 35, en donde el trastorno de hipersensibilidad se selecciona del grupo conformado por anafilaxis, urticaria y alergia a los alimentos.

37. El método de la Reivindicación 36, en donde el trastorno de hipersensibilidad es alergia a los alimentos.

38. El método de la Reivindicación 37, en donde la alergia a los alimentos resulta de exposición a una legumbre.

39. El método de la Reivindicación 38, en donde la legumbre es maní.

40. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en combinación con una antihistamina.

41. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en combinación con la administración de una antihistamina.

42. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en combinación con un broncodilatador.

43. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en

combinación con la administración de un broncodilatador.

44. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en combinación con un glucocorticoide.

45. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en combinación con la administración de un glucocorticoide.

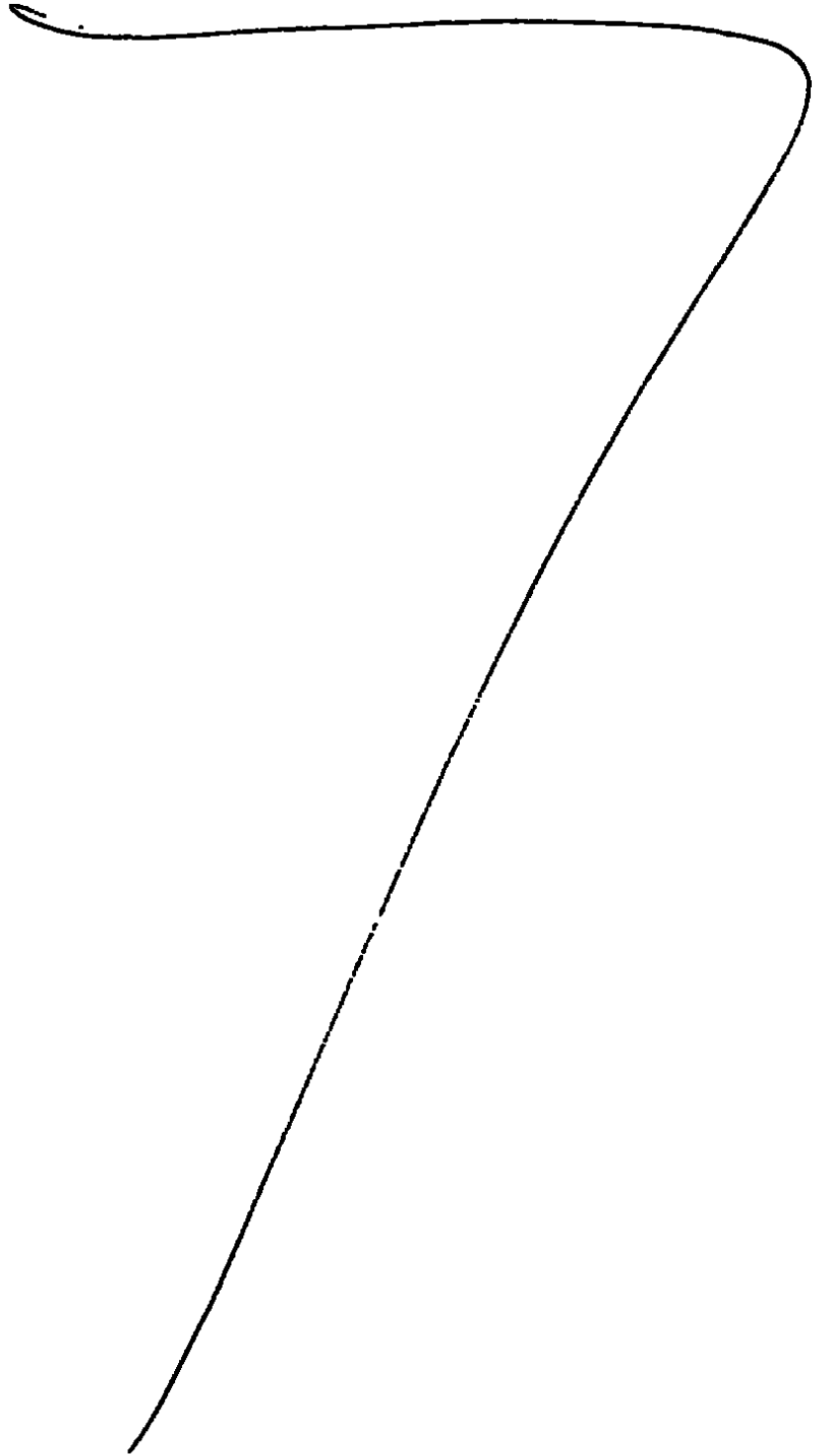
46. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en combinación con un glucocorticoide.

47. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en combinación con la administración de un glucocorticoide.

48. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en combinación con la administración de desensibilización a alérgeno.

49. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en combinación con un AINE.

50. Un método de tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación de la Reivindicación 20, en combinación con la administración de un AINE.



FORMULACIONES DE PROTEÍNA Y ANTICUERPO DE ALTA CONCENTRACIÓN

Extracto de la Divulgación

La presente solicitud se relaciona con formulaciones de proteína y anticuerpo con alta concentración, con viscosidad reducida, que son estables, relativamente isotónicas y son de baja turbiedad. Las formulaciones son particularmente apropiadas para administración subcutánea. La solicitud describe además artículos de manufactura, que contienen tales formulaciones, y un método para usarlas para tratar trastornos que pueden tratarse por la proteína o anticuerpo formulados.

Listado de la Secuencia

<110> Genentech, Inc.

<120> Formulaciones de Proteína y Anticuerpo de Alta Concentración

<130> P2026R1-PCT

<140> PCT/US2004/009613

<141> 2004-03-29

<150> US 60/460,659

<151> 2003-04-04

<160> 6

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> E25, cadena ligera

<400> 1

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

- <210> 2
- <211> 218
- <212> ---
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> E26, cadena ligera

<400> 2
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
20 25 30
Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
50 55 60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90
Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Hu-901, light chain

<400> 3
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
20 25 30
Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45
Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Ser Asp Ser Trp Pro Thr 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> 4
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> E25, cadena pesada

<400> 4

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	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	20	25	30	
Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	35	40	45	
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	50	55	60	
Asn	Pro	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His	95	100	105	
Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	110	115	120	
Ser	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	Val	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	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	260	265	270	
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	275	280	285	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	290	295	300	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	305	310	315	

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
320 325 330

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
335 340 345

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
350 355 360

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
365 370 375

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
380 385 390

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
395 400 405

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
410 415 420

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
425 430 435

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445 450

Lys

<210> 5
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> E26, cadena pesada

<400> 5
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 Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
20 25 30

Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
35 40 45

Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr
50 55 60

Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
95 100 105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120

Ser	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	Val	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
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val		260	265	270
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly		275	280	285
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr		290	295	300
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln		305	310	315
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys		320	325	330
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		335	340	345
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu		350	355	360
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly		365	370	375
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln		380	385	390
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp		395	400	405
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg		410	415	420
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala		425	430	435

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445 450

Lys

<210> 6

<211> 453

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

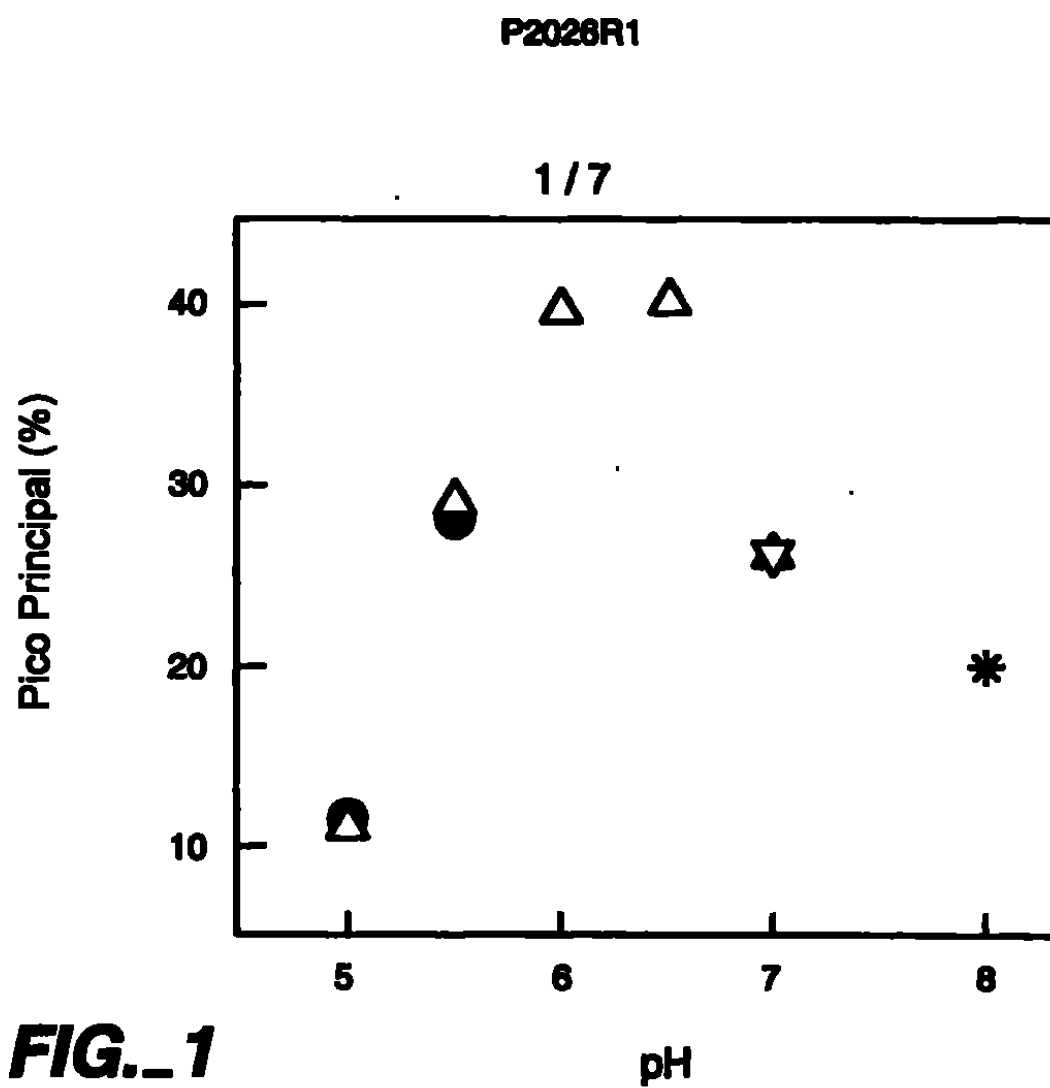
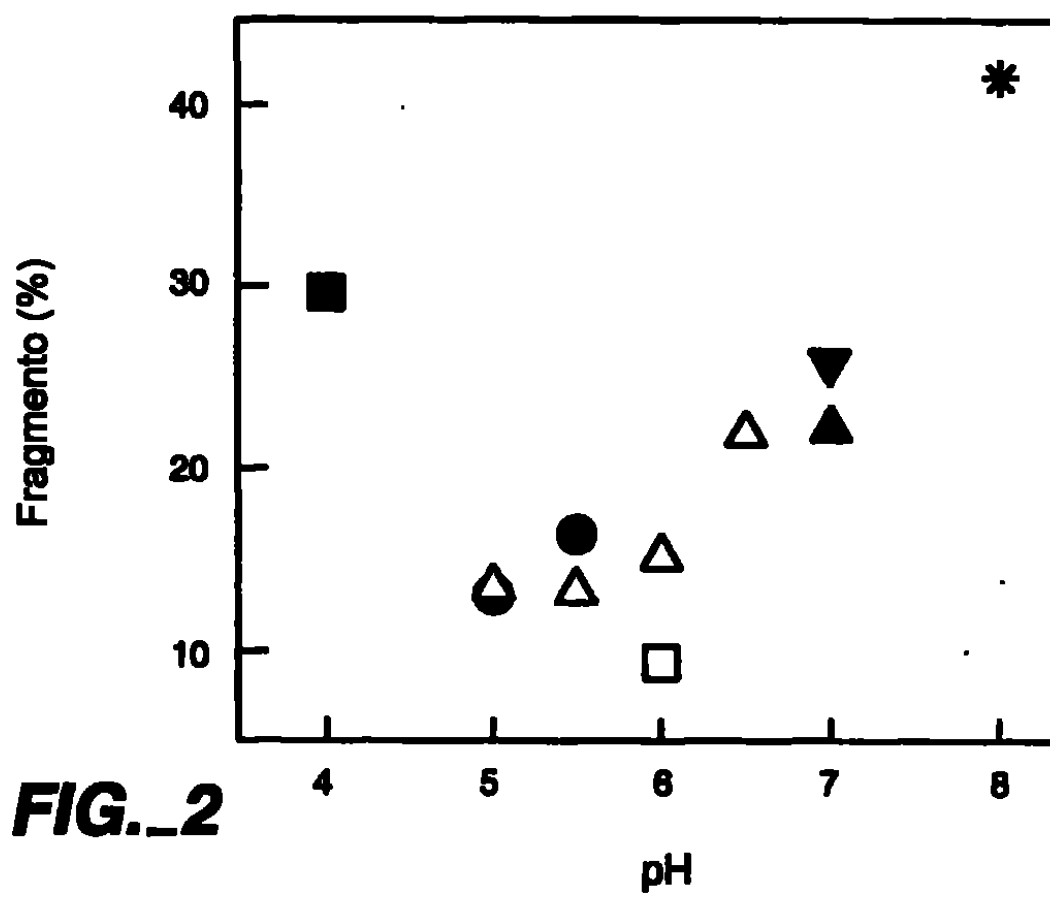
<220>

<223> Hu-901, cadena pesada

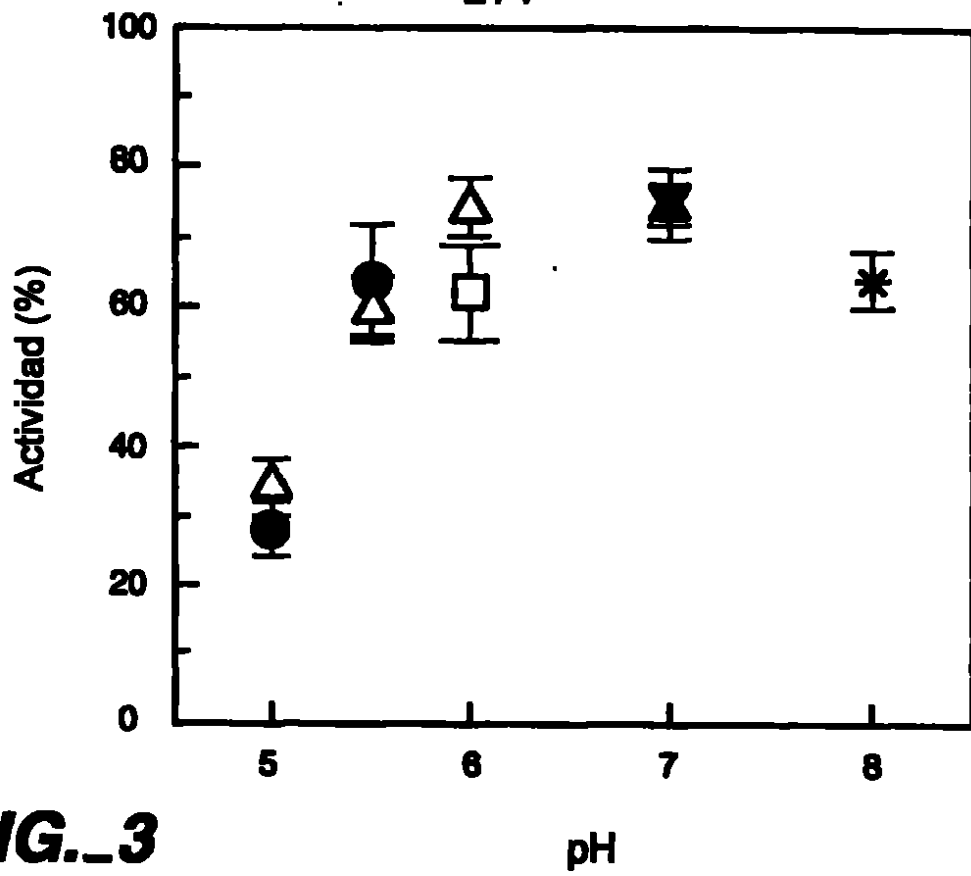
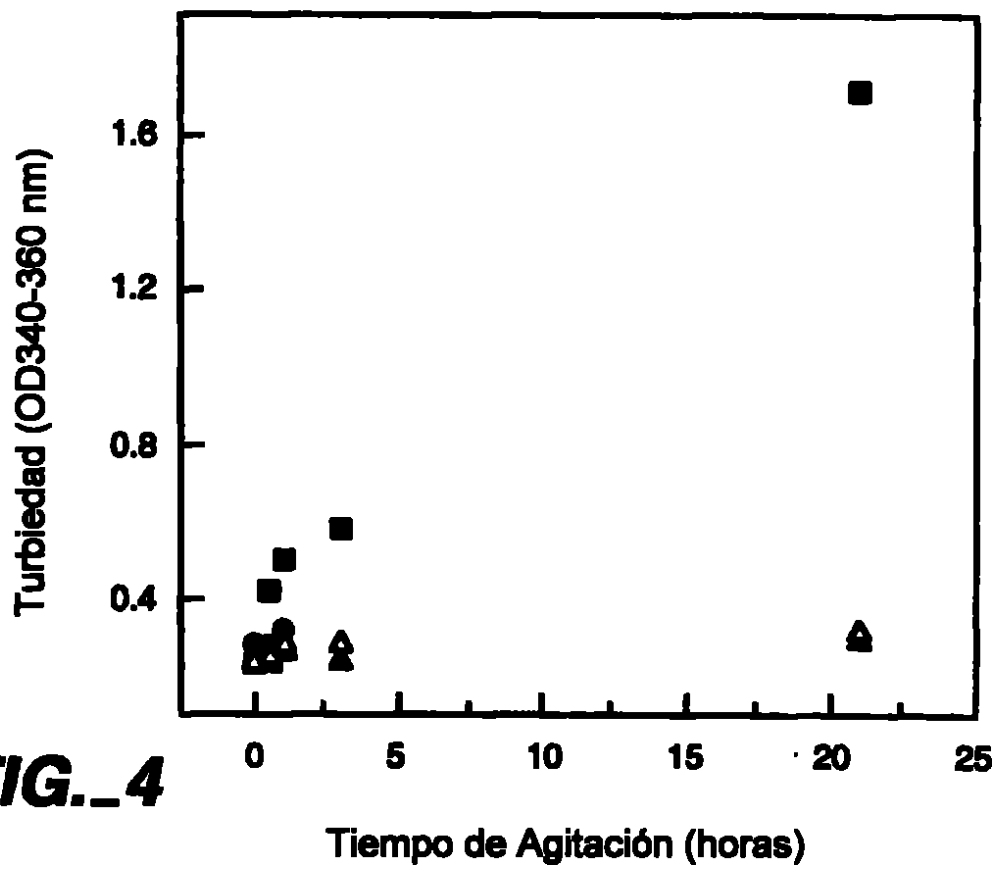
<400> 6

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

**FIG._1****FIG._2**

2 / 7

**FIG._3****FIG._4**

P2026R1

3 / 7

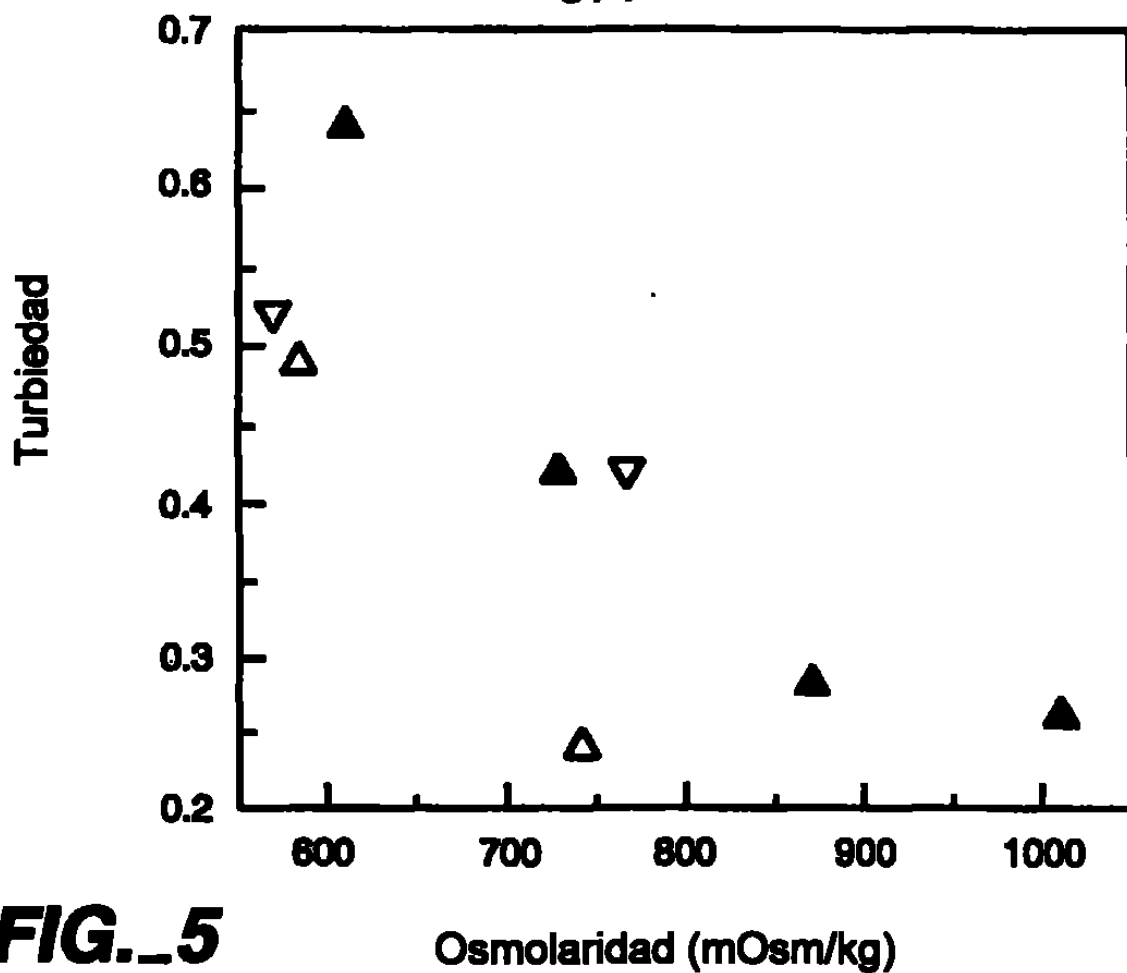


FIG._5

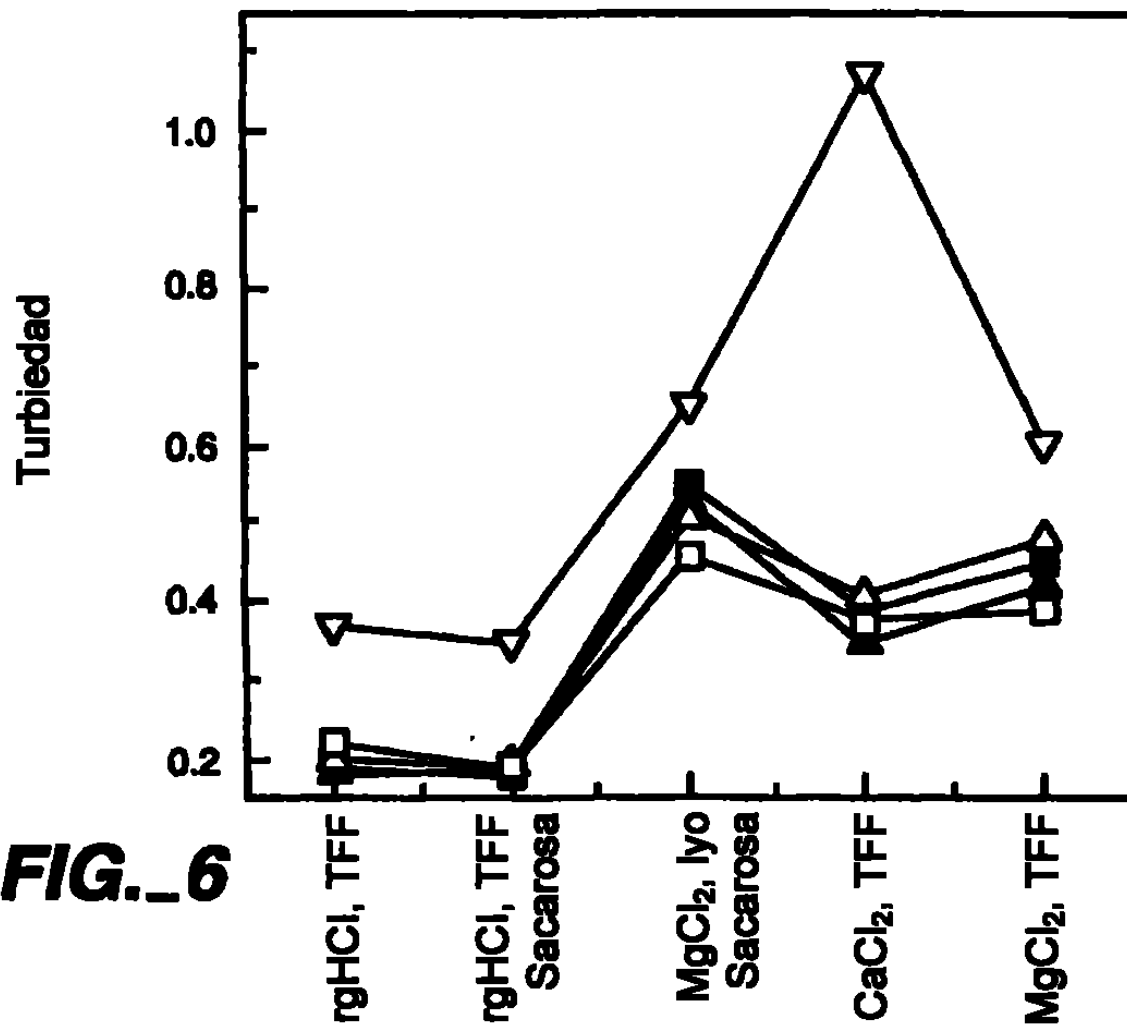


FIG._6

P2026R1

4/7

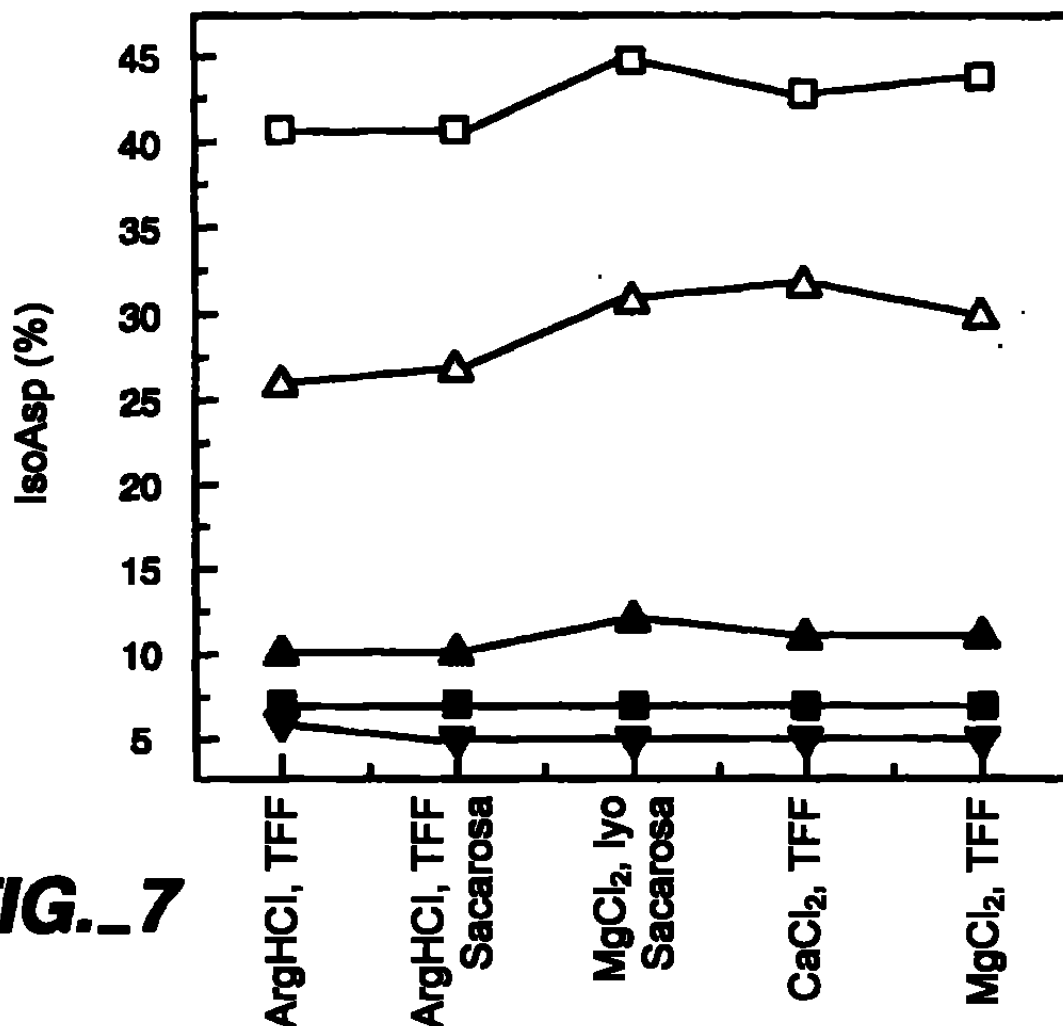


FIG._7

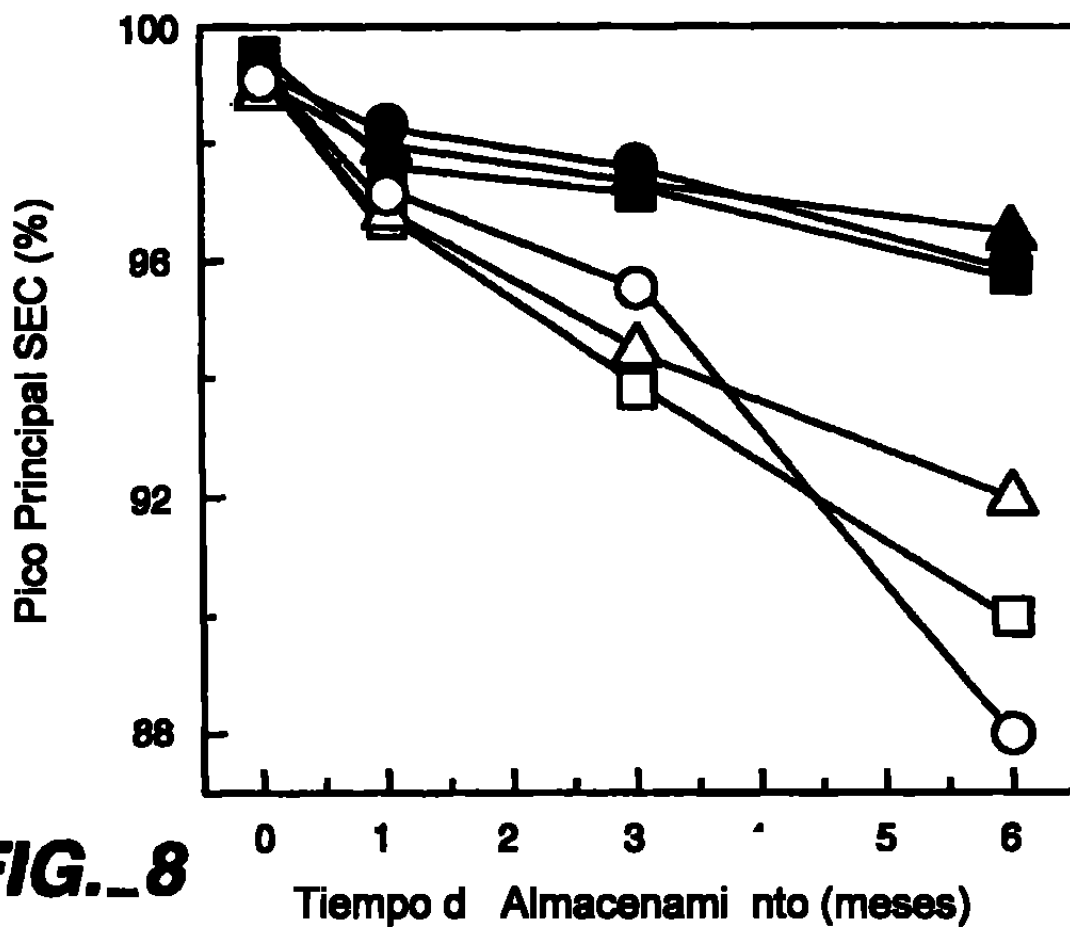


FIG._8

P2026R1

5 / 7

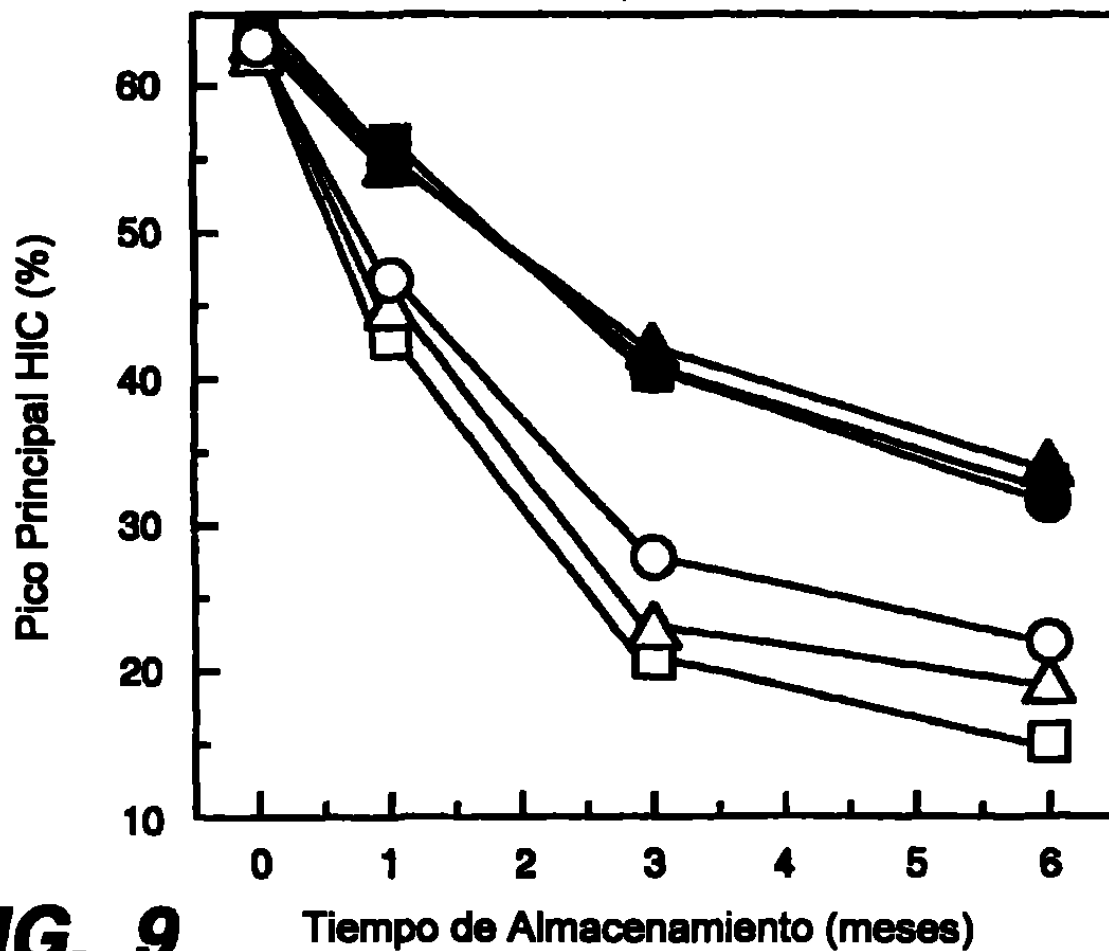


FIG._9

Anticuerpos Anti-IgE Cadena Ligera (Dominios V_L y C_L)

	10	20	30	40	50	60	70	80
E25	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RAQDSVD YDSDYD]	IWY	QOKPGKAPKL	LIY[AASTLES]	GVPSRFSGSG	SGTDFLTIS
E26	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RAQDSVD YDSDYD]	IWY	QOKPGKAPKL	LIY[AASTLES]	GVPSRFSGSG	SGTDFLTIS
Hu-901	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RAQDSVD YDSDYD]	IWY	QOKPGKAPKL	LIY[AASTLES]	GVPSRFSGSG	SGTDFLTIS
	90	100	110	C _L starts				
E25	SLOPEDFATY	YC[QDSDFY T]	FGQGTKVEI	KRT	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQD			
E26	SLOPEDFATY	YC[QDSDFY T]	FGQGTKVEI	KRT	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQD			
Hu-901	SLOPEDFATY	YC[QDSDFY T]	FGQGTKVEI	KRT	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQD			
E25	SKDSTYLSSTLTLSKADYEKKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC							
E26	SKDSTYLSSTLTLSKADYEKKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC							
Hu-901	SKDSTYLSSTLTLSKADYEKKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC							

FIG._10A

Anticuerpos Anti-IgE Cadena Pesada (Dominios V_H y C_H)

	10	20	30	40	50 a	60	70	80	90
25	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVS	YELT S[QYSNM]	IRQ	APGKGLNWVA	[SITTDGGTNY NPSVEG]	RITI	SRDSSKNIFY LQNSLRAED
26	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVS	YELT S[QYSNM]	IRQ	APGKGLNWVA	[SITTDGGTNY NPSVEG]	RITI	SRDSSKNIFY LQNSLRAED
hu-901	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVS	YELT S[QYSNM]	IRQ	APGKGLNWVA	[SITTDGGTNY NPSVEG]	RITI	SRDSSKNIFY LQNSLRAED
	100	110ab	120 C _H starts						
25	TAVTYCAR[GS	NYTQNSYFAY]	WGQGTILVTVSS	ASTKGPSVF	FLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS	MNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS			
26	TAVTYCAR[GS	NYTQNSYFAY]	WGQGTILVTVSS	ASTKGPSVF	FLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS	MNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS			
hu-901	TAVTYCAR	GS	NYTQNSYFAY]	WGQGTILVTVSS	ASTKGPSVF	FLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS	MNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS		
25	VVTVPSSSLGTQTYICNVN	HKPSMTKVDK	KVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVE						
26	VVTVPSSSLGTQTYICNVN	HKPSMTKVDK	KVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVE						
hu-901	VVTVPSSSLGTQTYICNVN	HKPSMTKVDK	KVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFMWYVDGVE						
25	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT	VLHQM	LNQKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTQNKQVSLTCLVKGFTPSDLAVENE						
26	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT	VLHQM	LNQKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTQNKQVSLTCLVKGFTPSDLAVENE						
hu-901	VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT	VLHQM	LNQKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTQNKQVSLTCLVKGFTPSDLAVENE						
25	SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRM	QQGNV	FSCSVMHREALHNHTTKSLSLSPGK						
26	SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRM	QQGNV	FSCSVMHREALHNHTTKSLSLSPGK						
hu-901	SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRM	QQGNV	FSCSVMHREALHNHTTKSLSLSPGK						

FIG._10B

Patent Docket No. P2026R1

PATENT COOPERATION TREATY/IB

In re Application of
GENENTECH, INC. et al.

International Application No.: PCT/US2004/009613

International Filing Date: 29 March 2004

Title: **HIGH CONCENTRATION ANTIBODY AND PROTEIN FORMULATIONS**

REQUEST TO ADD APPLICANT UNDER RULE 92bis

Via Facsimile (41-22) 338 82 70
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Dear Sirs:

Pursuant to Rule 92bis, Applicant requests the addition of the following applicant to the above-referenced International Application:

NOVARTS AG
Lichtstrasse 35
CH-4056 Basel
Switzerland

Applicant NOVARTIS AG should be indicated as Applicant for all designated States except US.

Applicants respectfully request prompt attention to this Request, in view of the 30 Month deadline of 04 October 2005.

Respectfully submitted,
GENENTECH, INC.

By: 
Craig G. Svoboda
Reg. No. 39,044

Dated: 12 August 2005
Genentech, Inc.
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990
United States of America
Tel. (650) 225-31489
Fax. (650) 952-9881

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.153)
0-5	Petition	
	The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P2026R1
I	Title of invention	HIGH CONCENTRATION ANTIBODY AND PROTEIN FORMULATIONS
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name:	GENENTECH, INC.
II-5	Address:	1 DNA Way South San Francisco, California 94080-4990 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	650-225-1000
II-9	Facsimile No.	650-952-9881
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	LIU, Jun
III-1-5	Address:	1108 Glacier Avenue Pacifica, California 94044 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	SHIRE, Steven
III-2-5	Address:	210 Sylvan Way Emerald Hills, California 94062 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	SVOBODA, Craig G.
IV-1-2	Address:	GENENTECH, INC. 1 DNA Way South San Francisco, California 94080-4990 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	650-225-1000
IV-1-4	Facsimile No.	650-952-9881
IV-1-6	Agent's registration No.	39,044
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	AGARWAL, Atulya R.; BARNES, Elizabeth M.; CARPENTER, David A.; CONLEY, Deirdre L.; CUI, Steven X.; TAN, Lee K.; JOHNSTON, Sean A.; LEE, Wendy M.; KUBINEC, Jeffrey S.; SCHWARTZ, Timothy R.; EVANS, David W.; MARSCHANG, Diane L.; HASAK, Janet E.; KRESNAX, Mark T.; NAIK, Paul; SHIN, Elinor K.; YEUNG, Bonny G.; PLEASURE, Irene T.
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the International filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

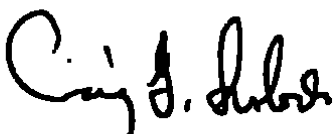
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	04 April 2003 (04.04.2003)	
VI-1-2	Number	60/460,659	
VI-1-3	Country	US	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1a	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VII	Declarations	Number of declarations	
VII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	-
IX-2	Description	81	-
IX-3	Claims	5	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	7	-
IX-7	TOTAL	98	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	reference no. none	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	6	
IX-29	Language of filing of the international application	English	

P2026R1

4/4

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	
X-1-1	Name:	SVOBODA, Craig G.
X-1-2	Name of signatory	
X-1-3	Capacity	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros)

I (We)

Genentech, Inc

1 DNA Way

South San Francisco, California

domiciled in 94080

USA

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 enseñanzas, 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 creyeran 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 sustituir 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, mla. (nuestros) apoderados en Colombia con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

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 vegetable 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, transigir, comprometer 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, mla. (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in South San Francisco, CA

this 12th day of May 2005

Signature

Name
Title

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

(See attached Certificate)

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

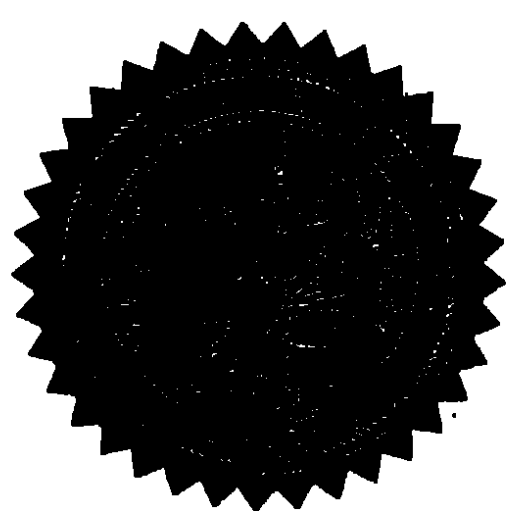
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. **Country: United States of America**
This public document
- 2. **has been signed by Aida Miclat Gulam**
- 3. **acting in the capacity of Notary Public, State of California**
- 4. **bears the seal/stamp of Aida Miclat Gulam, Notary Public, State of California**

CERTIFIED

- 5. **At Sacramento, California**
- 6. **the 17th day of May 2005**
- 7. **by Deputy Secretary of State, State of California**
- 8. **No. 239545**
- 9. **Seal/Stamp:**

10. **Signature**



CALIF RNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

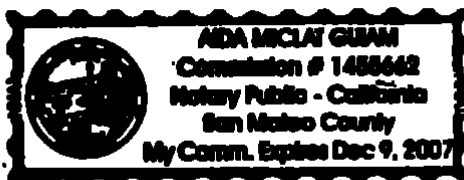
San Mateo

}

On May 12, 2005 before me, Aida Mielat Guism
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 Mielat Guism
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: _____

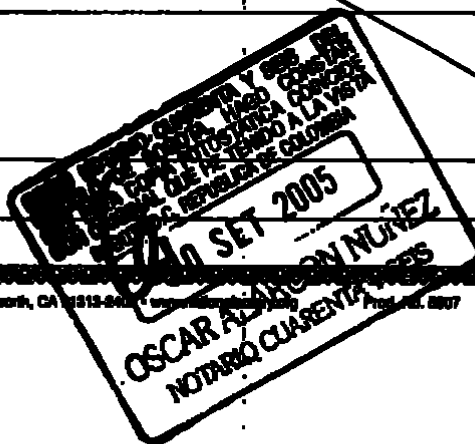
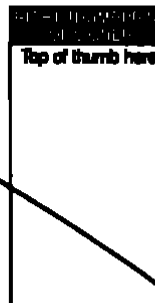
Signer(s) Other Than Named Above: _____

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: _____



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.



265
TRADUCCION AL ESPAÑOL del documento de poder dado por Genentech, Inc.,
domicillada en 1 DNA Way, South San Francisco, California, 94080 Estados
Unidos de America.

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 Gualm, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 17 de Mayo de 2005
7. por el Secretario de estado Delegado, Estado de California
8. No. 239545
9. Sello/Timbre

10. Firma



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

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

El 12 de Mayo de 2005, ante mi, Aida Miclat Guaim apareció personalmente Timoty 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 GUAIM
COMISION # 1455882
NOTARIO PUBLICO-CALIFORNIA
CONDADO DE ORANGE
COMISION EXPIRA EL 9 DE DICIEMBRE DE 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

Colocar sello de notario arriba

Miriam vargas

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 rescisión fraudulenta de este forma o 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: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí

- ☐ Individuo
- ☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
- ☐ Abogado de hecho
- ☐ Fideicomisario
- ☐ Guardián o conservador
- ☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí



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

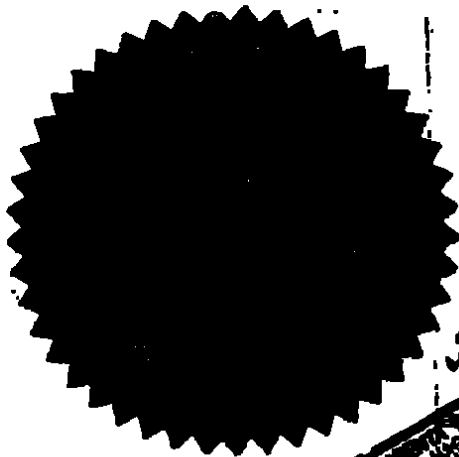
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

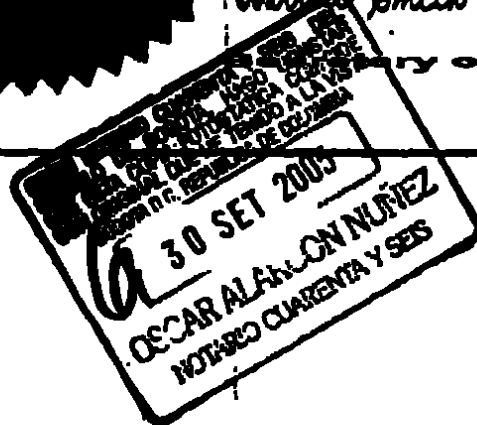
8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

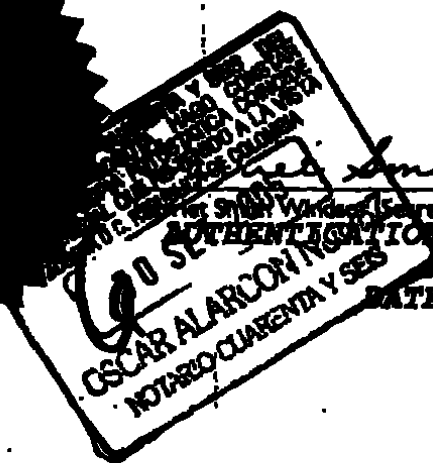
269

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 Windsor
Harriet Windsor, Secretary of State
NOTARY PUBLIC
Oscar Alarcon
NOTARIO PUBLICO Y SES
DATE: 05-24-05
3900384

**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").



STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549

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, per value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, per value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

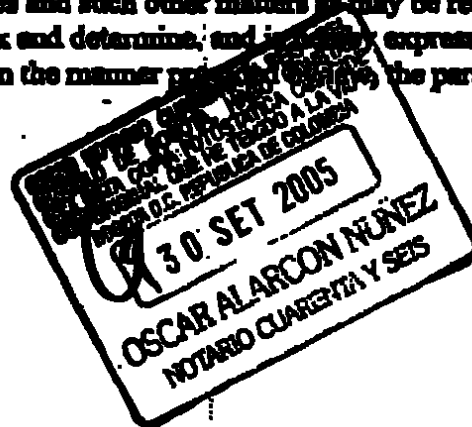
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the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

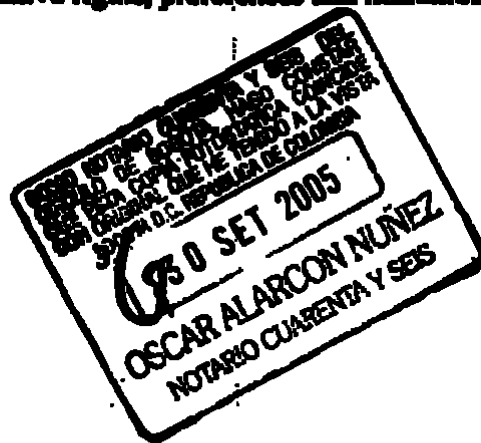
(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, 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 in the certificate, 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:



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.

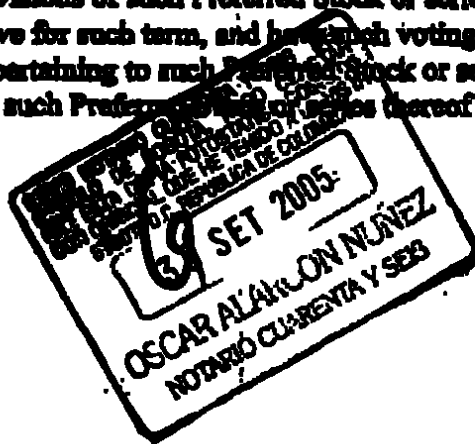
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(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.

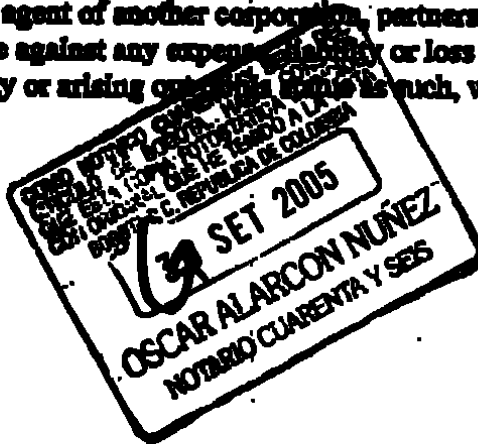
SECTION 6.02. Ballots. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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 such capacity, whether or



not the Corporation would have the power 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.

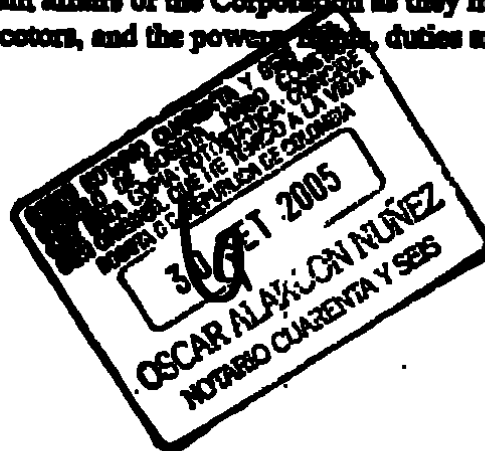
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect 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, duties and liabilities



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

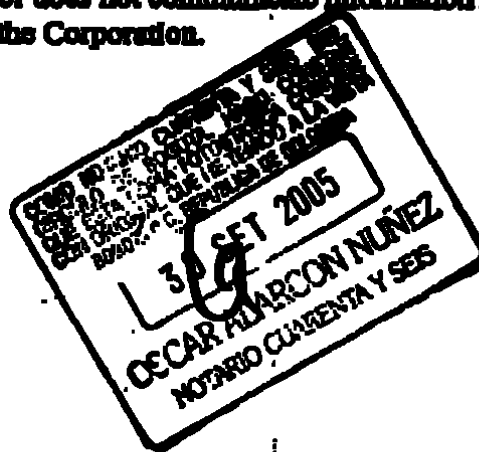
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing.

(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 or participate in the



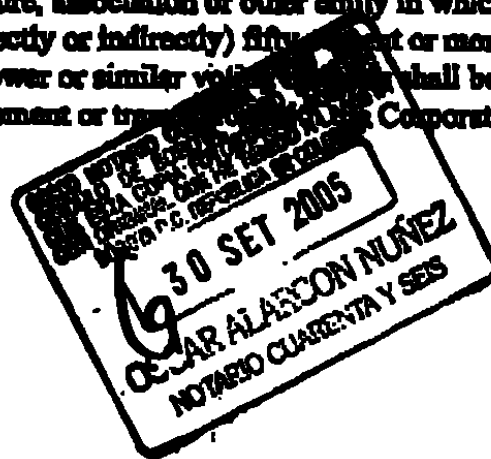
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, 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 interest shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



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.



**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 ser modificada la misma en adelante.

ARTICULO

SECCION 4.01. Acciones de Capital (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deban designarse respectivamente 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.

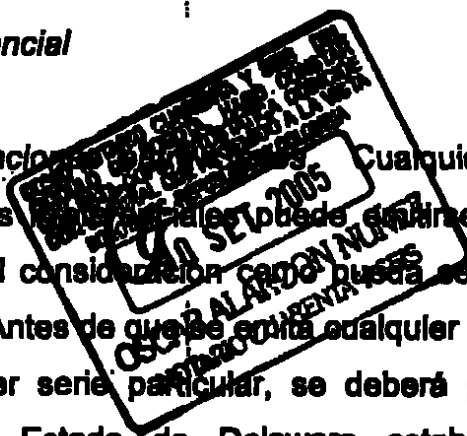
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de 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 de 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 condiciona la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. Acción Preferencial

(a) *Series y Límites de Variación.* 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



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, número 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;

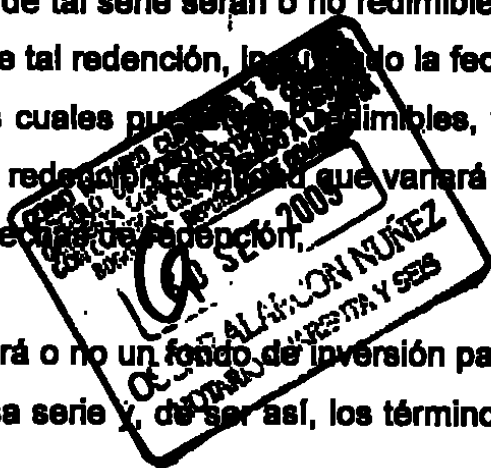
(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y la fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

(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, cualquiera que varará 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;



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 el 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 más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01 (c) 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 votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

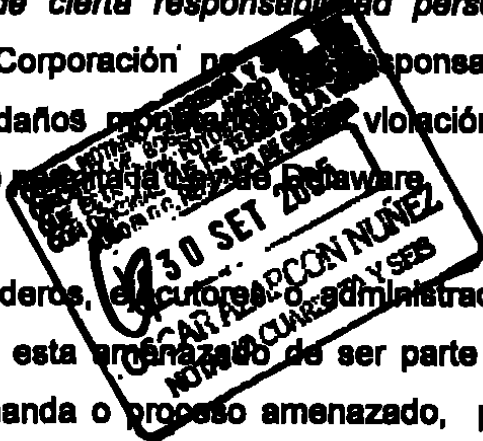
ARTICULO 6

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 personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo sea 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



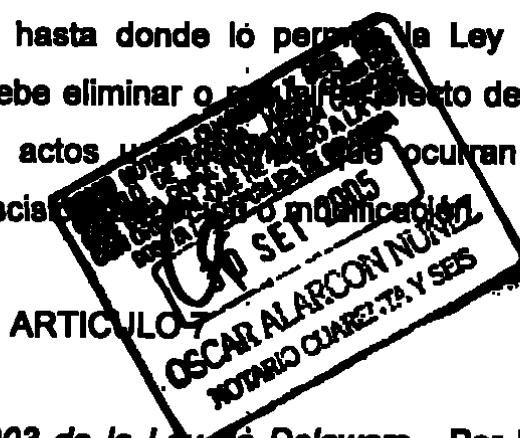
permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión con cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El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



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.

ARTICULO 8

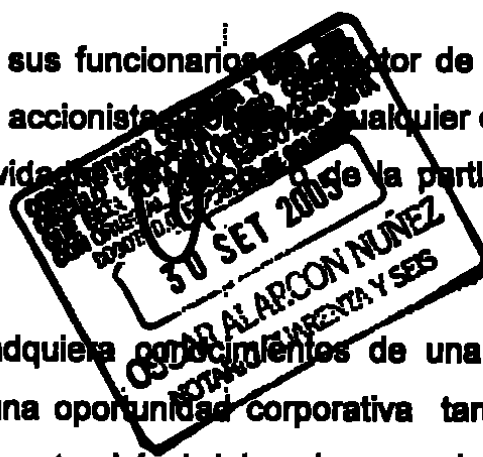
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define 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 artículos 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 cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades o líneas de negocios de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiera 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

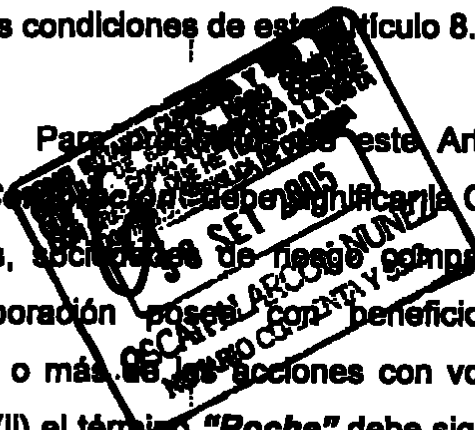


que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

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 adquiriera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya sea 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 adquiera 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 8.

SECCION 8.05. Definiciones. Para los fines de este Artículo 8 y el Artículo 9 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 un 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



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 sea 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 o 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 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

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 adquiera 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 o acuerdos. Para los 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 (directo 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

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 y Secretaría



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

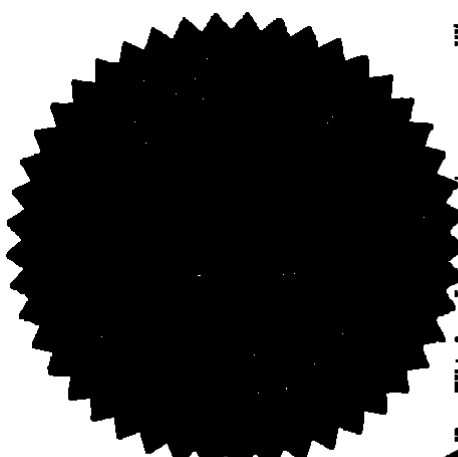
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

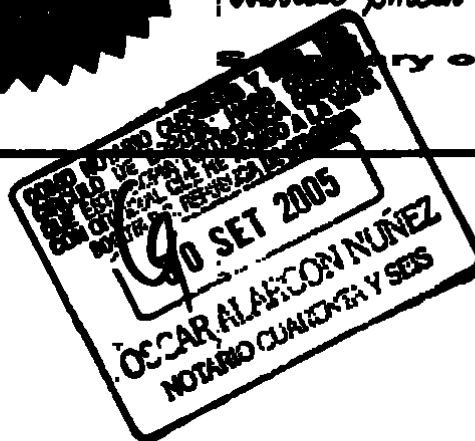
8. No. 0254031

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



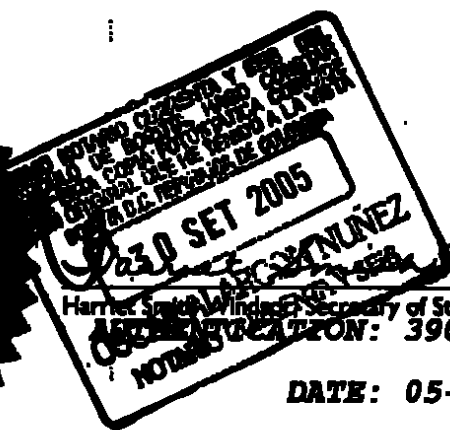
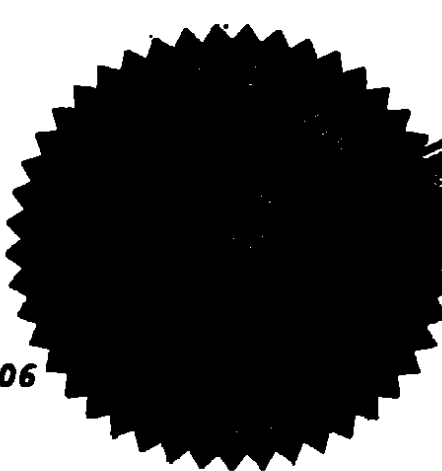
Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

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

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 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: 
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Secretary, General Counsel
Notary Public
OSCAR ALARCON NUÑEZ
NOTARIO CUARENTA Y SEIS

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

**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. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas 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"). Las acciones comunes de la Corporación será toda de una misma clase.

30 SET 2005
OSCAR ALARCON RIVERA
NOTARIO CUARENTA Y SEIS

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

300

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: Vicepresidenta, 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

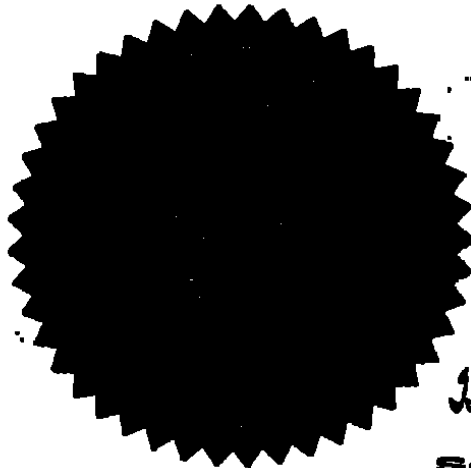
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

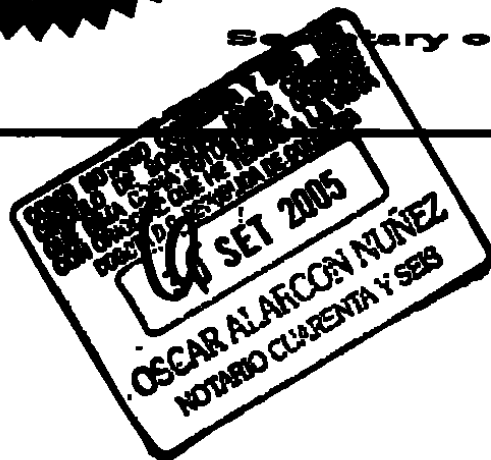
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

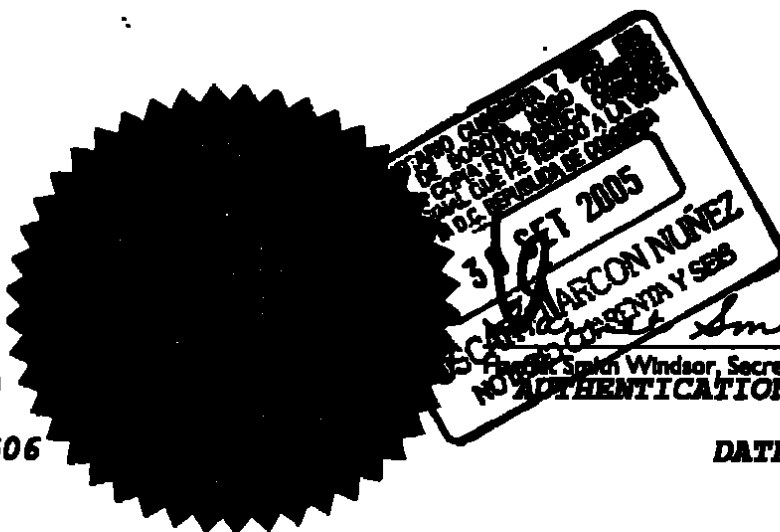
The First State

PAGE 1

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, Secretary of State
NOTARY PUBLIC: 3900387

DATE: 05-24-05

**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, per value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, per 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.

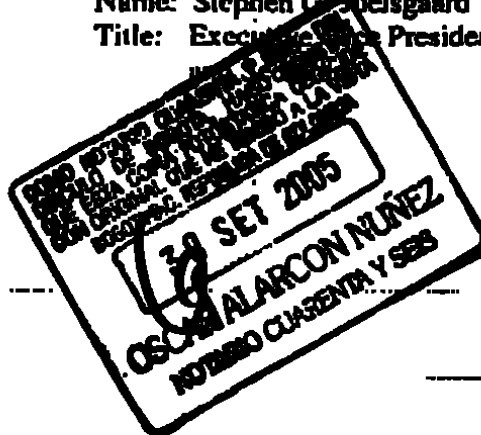
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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: Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President, General Counsel

#153087



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. Cien 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.

NOTARIO PUBLICO Y ABOGADO
OSCAR ALARCON RUÍZ
NOTARIO CUARENTA Y SEIS
30 SET 2008

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 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

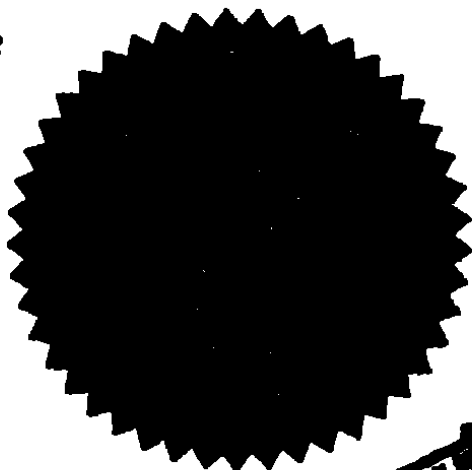
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



209

2112549

050426506

RECEIVED
SEP 08 2005
U.S. DEPARTMENT OF JUSTICE

DATE: 05-24-05

310

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.

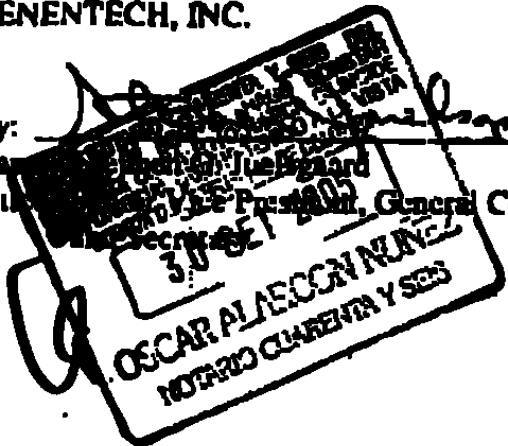
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

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, 2001.

GENENTECH, INC.

By: 
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: General Counsel



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

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

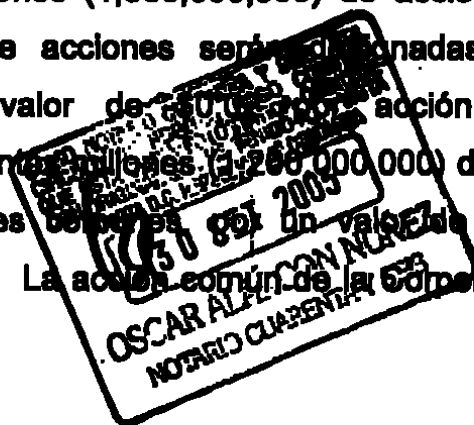
Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

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

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.



PATENT COOPERATION TREATY

CSE/EL
LS

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

GENENTECH, INC.
Attn. Svoboda, Craig G.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990
UNITED STATES OF AMERICA

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

01/10/2004

Applicant's or agent's file reference

P2026R1

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2004/009613

International filing date
(day/month/year)

29/03/2004

Applicant

GENENTECH, INC.

OCT 07 2004
GENENTECH, INC. v/s
LEGAL DEPT

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 18:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 18 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 18 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Catriona Cleere

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the letter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 18 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 48.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 48.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claims 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Part 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)".

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequences if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequences with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P2026R1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2004/009613	International filing date (day/month/year) 29/03/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 04/04/2003
Applicant GENENTECH, INC.		

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

This International Search Report consists of a total of 7 sheets.

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

1. Basis of the report

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

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

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

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

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

5. With regard to the abstract,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

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

6. With regards to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 6

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/009613

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/009613

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of Item 5 of the first sheet)

The present application relates to highly concentrated antibody and protein formulations with reduced viscosity that are stable, relatively isotonic and are of low turbidity. The formulations are particularly suitable for subcutaneous administration. The application further describes articles of manufacture containing such formulations and method for using them to treat disorders treatable by the formulated antibody or protein.

The formulations comprise arginine-HCl, histidine and polysorbate.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/009613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/395 A61K47/18 A61K47/06 //C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/30463 A (GENENTECH INC) 18 April 2002 (2002-04-18) cited in the application figure 3	1-16, 18-20, 22-50
A	EP 1 197 221 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 17 April 2002 (2002-04-17) the whole document	1-50
A	EP 0 787 497 A (MITSUI TOATSU CHEMICALS) 6 August 1997 (1997-08-06) the whole document	1-50
A	EP 0 909 564 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 21 April 1999 (1999-04-21) the whole document	1-50
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 September 2004		Date of mailing of the international search report 01/10/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6618 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wagner, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/009613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97/26909 A (GENETICS INST) 31 July 1997 (1997-07-31) the whole document	1-50
A	WO 97/04801 A (GENENTECH INC) 13 February 1997 (1997-02-13) cited in the application the whole document	1-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/009613

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0230463	A	18-04-2002	AU 1344102 A	22-04-2002
			CA 2423227 A1	18-04-2002
			EP 1324776 A2	09-07-2003
			WO 0230463 A2	18-04-2002
			US 2002045571 A1	18-04-2002
EP 1197221	A	17-04-2002	JP 2000247903 A	12-09-2000
			AU 772604 B2	06-05-2004
			AU 2695400 A	21-09-2000
			CA 2381229 A1	08-09-2000
			EP 1197221 A1	17-04-2002
			CN 1342087 T	27-03-2002
			WO 0051629 A1	08-09-2000
EP 0787497	A	06-08-1997	AU 686962 B2	12-02-1998
			AU 1243397 A	14-08-1997
			CN 1165034 A	19-11-1997
			EP 0787497 A2	06-08-1997
			JP 10265404 A	06-10-1998
			KR 236393 B1	15-12-1999
			NZ 314163 A	19-12-1997
			TW 509576 B	11-11-2002
			US 6013773 A	11-01-2000
EP 0909564	A	21-04-1999	AU 722300 B2	27-07-2000
			AU 2407497 A	19-11-1997
			EP 0909564 A1	21-04-1999
			US 6120761 A	19-09-2000
			US 6063734 A	16-05-2000
			US RE38188 E1	15-07-2003
			WO 9740850 A1	06-11-1997
			JP 3068033 B2	24-07-2000
			JP 10182481 A	07-07-1998
			JP 2000302689 A	31-10-2000
			JP 2004196824 A	15-07-2004
			TW 518219 B	21-01-2003
			US 6277367 B1	21-08-2001
			US 2004087507 A1	06-05-2004
			US 2001055582 A1	27-12-2001
WO 9726909	A	31-07-1997	US 5770700 A	23-06-1998
			AT 270557 T	15-07-2004
			AU 726498 B2	09-11-2000
			AU 1750097 A	20-08-1997
			CA 2241319 A1	31-07-1997
			DE 69729786 D1	12-08-2004
			EP 0876155 A1	11-11-1998
			JP 2000504327 T	11-04-2000
			WO 9726909 A1	31-07-1997
WO 9704801	A	13-02-1997	US 6267958 B1	31-07-2001
			AT 225185 T	15-10-2002
			AU 716785 B2	09-03-2000
			AU 6599296 A	26-02-1997
			AU 715338 B2	20-01-2000
			AU 6638196 A	26-02-1997
			BR 9609743 A	02-03-1999
			CA 2226575 A1	13-02-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/009613

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9704801	A	CA 2226624 A1	13-02-1997
		CN 1191490 A	26-08-1998
		DE 69624116 D1	07-11-2002
		DE 69624116 T2	18-06-2003
		DK 841946 T3	10-02-2003
		EP 0845997 A1	10-06-1998
		EP 0841946 A1	20-05-1998
		ES 2186796 T3	16-05-2003
		IL 122733 A	13-09-2001
		IL 122910 A	23-05-2002
		JP 11510170 T	07-09-1999
		JP 11510172 T	07-09-1999
		NO 980335 A	26-03-1998
		NZ 313503 A	28-01-2000
		NZ 500539 A	30-11-2001
		PT 841946 T	28-02-2003
		RU 2229288 C2	27-05-2004
		WO 9704801 A1	13-02-1997
		WO 9704807 A1	13-02-1997
		US 2001014326 A1	16-08-2001
		ZA 9606075 A	19-01-1998
		ZA 9606240 A	23-01-1998
		US 2003202972 A1	30-10-2003

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2004/009813

International filing date (day/month/year)
29.03.2004

Priority date (day/month/year)
04.04.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K39/395, A61K47/18, A61K47/06

Applicant
GENENTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80288 Munich
Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523658 epmu d
Fax: +49 89 2369 - 4485

Authorized Officer

Wagner, R

Telephone No. +49 89 2369-7357



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/US2004/009613

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☐ in written format
☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

326

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/US2004/009613

Box No. II Priority

1. ☒ The following document has not been furnished:☒ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(a)).☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(b)).

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

328

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/009613

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 28-50 (regarding IA)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 28-50 (IA) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

32

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/009613

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/a.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or
Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-50
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	17,21
	No: Claims	1-16, 18-20, 22-50
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-27
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2004/009613

Re Item I

Basis of the report

The sequence listing filed according to the required specifications was filed after the filing date and is therefore not considered as being part of the description (Rule 13^{ter}.1 (f) PCT).

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. Claims 28-50 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following document:
D1: WO 02/30463
2. For the assessment of the present claims 28-50 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.
3. The prior art does not disclose any formulation having the same components, at the same concentrations, as the formulations of claims 1 and 20. Therefore the subject-matter of claims 1-50 is novel (Article 33(2) PCT).

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2004/009613

4. The closest prior art is document D1, in which the applicant discloses (Figure 3) a formulation comprising: 40 mg/ml of anti-IgE antibody rhuMAb E25, 50 mM histidine, 0.01% polysorbate and seven salts at concentrations between 50 and 200 mM, one of the salts being arginine-HCl.

The difference between the formulation of D1 and the formulation in claim 1 lies in the higher concentration of the antibody rhuMAb E25 present in the formulation of claim 1. The technical problem to be solved is the provision of a formulation which allows a higher concentration of antibody rhuMAb E25, without increasing the turbidity, and without reducing the stability of the antibody. D1 does not give any indication that the choice of arginine-HCl results in a formulation which is less turbid (figure 5) and slightly more stable (figure 7) than those comprising $MgCl_2$ or $CaCl_2$. Therefore a formulation comprising the high concentration of the antibody rhuMAb E25 (claims 17,21) involves an inventive step (Article 33(3) PCT). The other claims are however directed to any protein and to any antibody or to other antibodies. The molecular weights and charge properties of proteins and antibodies, for example IgG compared to IgM, are so variable that it must be considered that the technical problem is only solved for the antibody rhuMAb E25 and that therefore claims 1-16, 18-20, 22-50 do not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

5. Independent claim 8 is not clear (Article 6 PCT) because the concentration range 100 mg/ml to 200 mg/ml does not lie within the range of 50 to 200 mM of claim 1, on which claim 8 is dependent.
6. The claims (16-19, 21) in which antibodies are designated by internal denominations are not clear (article 6 PCT). The antibodies should be identified by their sequences.

332

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 05899863 000000000
Fecha (OPD) : 2005-10-03 16:20:57 Folios: 329
Trámite : 011 PCI-PATENT J/A PRE PRECI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒	☒	☒
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA ☒ INCOMPLETA () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA ☒ INCOMPLETA () ()

Firma Responsable:

Fecha:

3-oct-05

331
333

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

REFERENCIA	Radicación No.	5 99863
	Solicitud internacional	US2004/009613
	Fecha inicio fase nacional	04/11/2005
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1000?

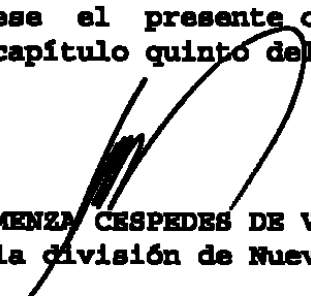
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado por la sociedad NOVARTIS AG, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 28 JUL 2005
adpal