



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

LOTE 72

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-38013A

21. EXPEDIENTE No. 07-38013 A

54. TÍTULO FORMULACIÓN DE ANTICUERPO
EN AMORTIGUADOR DE ACETATO DE
HISTIDINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE GENENTECH INC.

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D. C., _____



No. 07-038013-A-00000-0000

Fecha: 2012-10-02 14:26:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 559

AS: 103.411

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



No. 07-038013-00000-0000

Fecha: 2007-04-17 16:48:33 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 559

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GENENTECH, INC.

Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA
94080-4990, US

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Carrera 7 # 71 - 21 Torre B - Piso 4

Teléfono: 744-2200 Fax: 744-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: James D. ANDYA, Shiang C. GWEE, Jun LIU, Ye SHEN

Dirección: 227 Richmond Drive, Apt. D, Millbrae, CA 94030 (US); 565 Crespi Drive, Pacifica, CA
94044 (US); 1108 Glacier Avenue, Pacifica, CA 94044 (US); 386 Faxon Avenue, San Francisco, CA
94112, US (Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/037471 Fecha 19-10-2005

Publicación Internacional No. WO 2006/044908 A3 Fecha 27-04-2006

6 Título (54): FORMULACIÓN DE ANTICUERPO EN AMORTIGUADOR DE ACETATO DE HISTIDINA

7 Clasificación Internacional (51) A61K 39/395, 47/18

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

20-10-2004

(31) Número de Solicitud

60/620,413

9 Comprobante de pago No. 07-13,502

Fecha 13-04-2007

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

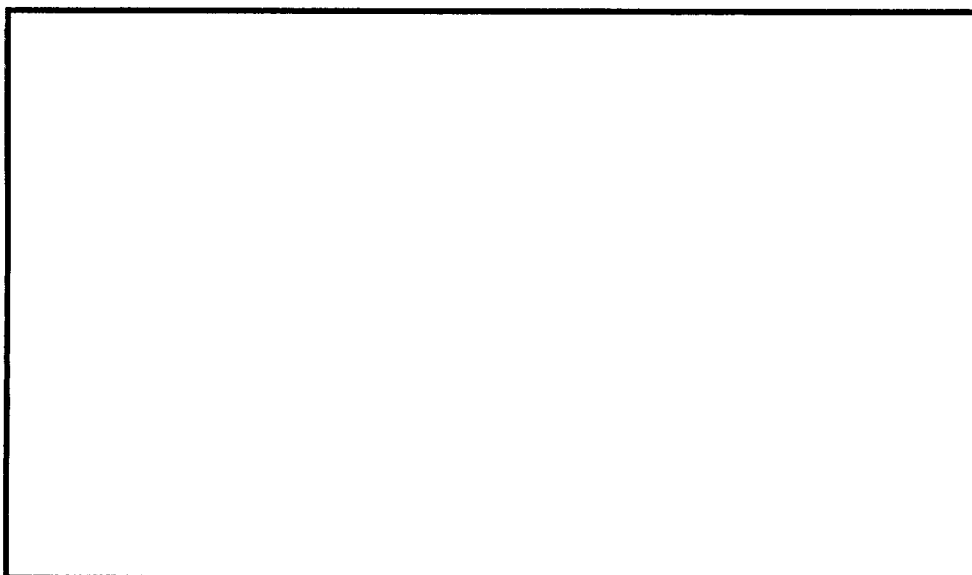
2020-F06 (01-11-11)

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$482.000
- ☒ 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: Listado de Secuencias
Tarjeta de Propietarios
Documentos PCT

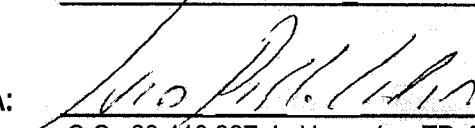
11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:


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

10
3



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Financiado reservado para el adhesivo de radicación

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-038013-A-00000-0000

Fecha: 2012-10-02 14:26:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 559

AS. 122.189

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1.

Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2.

Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

GENENTECH, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☒ NIT

☐ Otro

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	1 DNA Way, CA 94080	South San Francisco
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3.

Datos del apoderado:

CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

Apellidos y Nombre

80.410.337

Documento de identificación

57492

Tarjeta profesional

4. Datos del trámite		
CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente:	Expediente: 07 038.013	Expediente:
De:	De:	De:
A:	A:	A:

5. Anexos	
Comprobante de pago No. 12-81267, 12-91064	Fecha: 06.09.2012

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.
☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación.
☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división.
☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud.
☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

7. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO	
C.C 80.410.337	Tarjeta Profesional 57492

122107 1, 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0081267
		Bogotá D.C., Agosto 08 de 2012 - 17:03:39

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.	NI 860.047.372
-------------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	447734755	08/08/2012	35.011.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	
			Vr. UNDITARIO Vr. CONCEPTO
			590.000.00 590.000.00
			\$590.000.00
			=====

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-038013-A-00000-0000
Fecha: 2012-10-02 14:26:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 559

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-038013-00008-0000
Fecha: 2012-09-08 16:18:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 525 RESPUESTA Folios: 177

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0091064
		Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2012 - 15:54:43

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.	NI 860.047.372
-------------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	447749621	05/09/2012	6.970.000.00

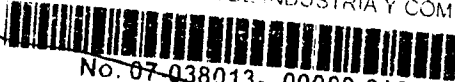
*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
69 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	
			Vr. UNDITARIO Vr. CONCEPTO
			30.000.00 2.070.000.00
			\$2.070.000.00

SON: ****DOS MILLONES SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE****

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-038013-A-00000-0000
Fecha: 2012-10-02 14:26:45 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 559

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-038013-00008-0000
Fecha: 2012-09-05 16:18:19 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 177

FORMULACIONES DE ANTICUERPO

Ésta es una solicitud no provisional presentada bajo 37 CFR 1.53(b) que reivindica prioridad a la solicitud provisional 60/620,413 presentada el 20 de octubre de 2004, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia.

Campo de la Invención

La presente invención concierne a formulaciones de anticuerpo, incluidos anticuerpos monoclonales formulados en amortiguador de acetato de histidina, así como a una formulación que comprende un anticuerpo que se une al dominio II de HER2 (por ejemplo, Pertuzumab), y a una formulación que comprende un anticuerpo que se une a DR5 (por ejemplo, Apomab).

Antecedentes de la Invención

En los diez últimos años, los avances en biotecnología han hecho posible producir una variedad de proteínas para aplicaciones farmacéuticas utilizando técnicas de ADN recombinante. Debido a que las proteínas son más grandes y más complejas que los medicamentos orgánicos e inorgánicos tradicionales (es decir, que poseen múltiples grupos funcionales además de estructuras tridimensionales complejas), la formulación de tales proteínas plantea problemas especiales. Para que una proteína permanezca biológicamente activa, una formulación tiene que preservar intacta la integridad de conformación de por lo menos una secuencia central de aminoácidos de la proteína, protegiendo al mismo tiempo contra la degradación los múltiples grupos funcionales de la proteína. Las rutas de degradación para las proteínas pueden involucrar inestabilidad química (es decir, cualquier proceso que implique modificación de la proteína mediante formación de enlaces o corte proteolítico resultante en una nueva entidad química), o inestabilidad física (es decir, cambios en la estructura de mayor orden de la proteína). La inestabilidad química puede resultar de desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, eliminación beta o intercambio de disulfuros. La inestabilidad física puede resultar de desnaturalización, agregación, precipitación y adsorción, por ejemplo. Las tres rutas más comunes de degradación de las proteínas son la agregación, desamidación y oxidación de proteínas. Cleland *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993).

Formulaciones de Anticuerpo

Los anticuerpos forman parte de las proteínas usadas para aplicaciones farmacéuticas. Un ejemplo de un anticuerpo útil para terapia es un anticuerpo que se une al antígeno HER2, tal como Pertuzumab.

La Patente de los Estados Unidos No. 6,339,142 describe una composición de anticuerpo HER2, que comprende una mezcla de anticuerpo anti-HER2 y una o más variantes ácidas del mismo, en donde la cantidad de la(s) variante(s) ácida(s) es menos de alrededor del 25%. Un anticuerpo HER2 ejemplar es Trastuzumab.

Las Patentes de los Estados Unidos No. 6,267,958 y 6,685,940 (Andya *et al.*) describen formulaciones liofilizadas de anticuerpo, incluidas formulaciones de anticuerpo HER2 e IgE. WO97/04807 y US 2004/0197326A1 (Fick *et al.*) describen métodos para tratar asma alérgico con un anticuerpo IgE. WO99/01556 (Lowman *et al.*) se refiere a un anticuerpo IgE con residuos aspartilo propensos a isomerización, y variantes mejoradas del mismo. US 2002/0045571 (Liu *et al.*) provee formulaciones concentradas de proteína de viscosidad reducida, ejemplificadas por formulaciones del anticuerpo IgE humanizado, rhuMAb E25 y E26. WO 02/096457 y US 2004/0170623 (Arvinte *et al.*) describen formulaciones líquidas estables que comprenden el anticuerpo anti-IgE E25. Véase, además, US 2004/0197324 A1 (Liu y Shire) concerniente a una formulación anti-IgE de concentración elevada.

La Patente de los Estados Unidos No. 6,171,586 (Lam *et al.*) describe formulaciones estables acuosas de anticuerpo. Un anticuerpo F(ab')₂ rhuMAb CD 18 se formuló en amortiguadores de acetato de sodio e histidina-HCl. La formulación preferida para rhuMAb CD18 fue 10mM de acetato de sodio, 8% trehalosa, 0.01% TWEEN 20™, pH 5.0. Las formulaciones en acetato (pH 5.0) de rhuMAb CD20 almacenadas a 40° durante un mes demostraron una mayor estabilidad que aquellas muestras formuladas en histidina (pH 5.0 ó 6.0).

US 2003/0190316 (Kakuta *et al.*) concierne al anticuerpo hPM-1 formulado, un anticuerpo de receptor IL-6 humanizado. La pérdida de monómero fue máxima en citrato de sodio (pH 6.7), seguida por fosfato de sodio (pH 6.8), Tris-HCl (pH 7.2), histidina-HCl (pH 7.2) y glicina (pH 7.6) en orden descendente. Se evaluó el efecto de fosfato-Na (pH 6.5), fosfato-His (pH 6.0 o 6.5), His-HCl (pH 6.5), y fosfato-Na (pH 6.0) sobre la estabilidad de hPM-1.

WO2004/071439 (Burke *et al.*) establece que surgieron impurezas en una formulación de natalizumab (anticuerpo monoclonal humanizado de integrina anti-alpha4) de la degradación de polisorbato 80, aparentemente a través de una

reacción de oxidación que implicaba iones de metal e histidina. Es consecuencia, se seleccionó un amortiguador de fosfato.

WO 2000/066160 (contraparte en idioma inglés de EP 1 174 148A1) (Okada *et al.*) se refiere a una formulación de anticuerpo C4G1 humanizado, que se une a un receptor de fibrinógeno de una glucoproteína de membrana plaquetaria humana GPIIb/IIIa, en un amortiguador de fosfato de sodio o citrato de sodio.

WO2004/019861 (Johnson *et al.*) concierne a CDP870, un fragmento Fab anti-TNF α pegilado, formulado a 200mg/ml en 50mM de acetato de sodio (pH 5.5) y 125mM de cloruro de sodio.

WO2004/004639 (Nesta, P.) se refiere a una formulación para huC242-DM1, una inmunotoxina activada por tumor, en 50mM de un amortiguador de ácido succínico (pH 6.0) y sacarosa (5% p/v).

WO03/039485 (Kaisheva *et al.*) descubrió que Daclizumab (un anticuerpo de receptor EL-2 a humanizado) tenía la máxima estabilidad en amortiguador de succinato de sodio a pH 6.0, y perdía potencia rápidamente en histidina, a medida que el amortiguador se oxidaba.

WO 2004/001007 concierne a un anticuerpo monoclonal CD80 en un amortiguador de HCl de histidina, acetato de sodio o citrato de sodio.

La Patente de los Estados Unidos No. 6,252,055 (Relton, J.) se refiere a anticuerpos anti-CD4 y anti-CD23 formulados en amortiguadores de maleato, succinato, acetato de sodio o fosfato, indentificándose el fosfato como el amortiguador preferido.

La Patente de los Estados Unidos No. 5,608,038 (Eibl *et al.*) se refiere a preparaciones altamente concentradas de inmunoglobulina policlonal con inmunoglobulina, glucosa o sacarosa, y cloruro de sodio contenido en ellas.

WO03/015894 (Oliver *et al.*) se refiere a una formulación acuosa de 100mg/mL SYNAGIS®, 25mM histidina-HCl, 1.6mM glicina, pH 6.0, y una SYNAGIS® liofilizada la cual, cuando se formula (antes de la liofilización), contiene 25 mM de histidina, 1.6mM de glicina y 3% p/v de manitol a pH 6.0.

US 2004/0191243 A1 (Chen *et al.*) divulga una formulación de ABX-IL8, un anticuerpo IgG2 humano.

US 2003/0113316 A1 (Kaisheva *et al.*) se refiere a una formulación liofilizada de anticuerpo de receptor anti-IL2.

Anticuerpos HER2

La familia HER de tirosina cinasas de receptor son importantes mediadores del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores

incluye cuatro miembros distintos incluido el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1, o HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

EGFR, codificado por el gen erbB1, ha sido casualmente implicado en neoplasia maligna humana. En particular, se ha observado una expresión cada vez mayor de EGFR en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, así como en glioblastomas. La creciente expresión del receptor EGFR se asocia a menudo con una producción en aumento del ligando EGFR, factor α de crecimiento transformante (TGF- α), por las mismas células tumorales resultante en una activación del receptor por una ruta estimuladora autocrina. Baselga and Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, TGF- α y EGF, han sido evaluados como agentes terapéuticos en el tratamiento de tales neoplasias malignas. Véase, por ejemplo, Baselga and Mendelsohn., *supra*; Masui *et al. Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); y Wu *et al. J. Clin. Invest.* 95: 1897-1905 (1995).

El segundo miembro de la familia HER, p185^{neu}, se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del protooncogén *neu* resulta de una mutación puntual (valina en ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en neoplasias malignas de mama y ovario y se correlaciona con una prognosis deficiente (Slamon *et al., Science*, 235: 177-182 (1987); Slamon *et al., Science*, 244:707-712 (1989); y Patente de los Estados Unidos No. 4,968,603). A la fecha, no se ha informado una mutación puntual análoga a la hallada en el protooncogén *neu* para tumores humanos. La sobreexpresión de HER2 (con frecuencia, pero no uniformemente, debida a amplificación génica) se ha observado igualmente en otros carcinomas, incluidos carcinomas del estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véase, entre otros, King *et al., Science*, 229:91 A (1985); Yokota *et al., Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushima *et al., Mol Cell Biol*, 6:955-958 (1986); Guerin *et al., Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen *et al., Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura *et al., Cancer Res.*, 51: 1034 (1991); Borst *et al., Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner *et al., Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern *et al., Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park *et al., Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau *et al., Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland *et al., Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams *et al., Pathobiology* 59:46-52 (1991); y McCann *et al., Cancer*, 65:88-92 (1990). HER2 puede

sobreexpresarse en cancer de próstata (Gu *et al.*, *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross *et al.*, *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross *et al.*, *Cancer* 79:2162-70 (1997); y Sadasivan *et al.*, *Urol.* 150:126-31 (1993)).

Se han descrito anticuerpos dirigidos contra el 185^{neu} de rata y productos de proteína HER2 humana. Drebin y colegas han cultivado anticuerpos contra el producto génico *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin *et al.*, *Cell* 41:695-706 (1985); Myers *et al.*, *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); y WO94/22478. Drebin *et al.*, *Oncogene* 2:273-277 (1988) informan que mezclas de anticuerpos que reaccionan con dos regiones distintas de p185^{neu} resultan en efectos sinérgicos anti-tumorales sobre células NIH-3T3 transformadas con *neu*, implantadas en ratones inmunitariamente desprotegidos. Véase también la Patente de los Estados Unidos 5,824,311 expedida el 20 de octubre de 1998.

Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989) describen la generación de panel de anticuerpos HER2, que se caracterizaron usando la línea celular SK-BR-3 de tumor de mama humano. La proliferación celular relativa de las células SK-BR-3, luego de la exposición a los anticuerpos, se determinó mediante tinción con cristales de violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este análisis, se obtuvo la máxima inhibición con el anticuerpo denominado 4D5, el cual inhibió la proliferación celular en 56%. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular en una magnitud menor en este análisis. Se encontró además que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba las líneas celulares de tumor de mama, que sobreexpresaban HER2, a los efectos citotóxicos de TNF- α . Véase también la Patente de los Estados Unidos No. 5,677,171 expedida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos HER2, discutidos en Hudziak *et al.*, se caracterizan igualmente en Fendly *et al.*, *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts *et al.*, *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup *et al.*, *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard *et al.*, *J. Clin. Immunol.* 11(3): 117-127 (1991); Kumar *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras *et al.*, *Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta *et al.*, *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665 (1994); Scott *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'Souza *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis *et al.*, *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); y Schaefer *et al.*, *Oncogene* 15:1385-1394 (1997). Una versión humanizada recombinante del anticuerpo HER2 murino 4D5 (huMAb4-D5-8, rhuMAb HER2, Trastuzumab o HERCEPTIN®; Patente de los Estados Unidos No. 5,821,337) es clínicamente activa en pacientes con

neoplasias malignas de mama metastásicas que sobreexpresan HER2, los cuales han recibido terapia previa extensiva anti-cáncer (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). El Trastuzumab recibió aprobación de comercialización de la Dirección de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer metastático de mama, cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2.

Otros anticuerpos HER2 con varias propiedades se han descrito en Tagliabue *et al.*, *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie *et al.*, *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier *et al.*, *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al.*, *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski *et al.*, *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al.*, *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu *et al.*, *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk *et al.*, *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock *et al.*, *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver *et al.*, *Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al.*, *Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992); Patente de los Estados Unidos No. 5,783,186; y Klapper *et al.*, *Oncogene* 14:2099-2109 (1997).

El cribado de la homología ha resultado en la identificación de dos otros miembros de la familia del receptor HER; HER3 (Patentes de los Estados Unidos No. 5,183,884 y 5,480,968, así como Kraus *et al.*, *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)) y HER4 (Solicitud de Patente EP No. 599,274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993)). Estos dos receptores exhiben una expresión cada vez mayor en por lo menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

Los receptores HER se encuentran generalmente en varias combinaciones en células, y se cree que la heterodimerización incrementa la diversidad de las respuestas celulares a una variedad de ligandos HER (Earp *et al.*, *Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). EGFR se une por seis ligandos diferentes; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor α de crecimiento transformante (TGF- α), anfirregulina, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), betacelulina y epirregulina (Groenen *et al.*, *Growth Factors* 11:235-257 (1994)). Una familia de proteínas de herregulina, resultantes del corte y empalme alternativo de un solo gen, son ligandos para HER3 y HER4. La familia de herregulina incluye las herregulinas α , β y γ (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); Patente de los Estados Unidos No. 5,641,869; y Schaefer *et al.*, *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)); factores de diferenciación *neu* (NDFs),

factores de crecimiento glial (GGFs); actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de neuronas motoras y sensoras (SMDF). Para una reseña, véase Groenen *et al.*, *Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lernke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996) y Lee *et al.*, *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995). Recientemente se identificaron tres ligandos HER adicionales; neurregulina-2 (NRG-2), de la que se informa que se une a HER3 ó HER4 (Chang *et al.*, *Nature* 387 509-512 (1997); y Carraway *et al.*, *Nature* 387:512-516 (1997)); neurregulina-3 que une HER4 (Zhang *et al.*, *PNAS (USA)* 94(18):9562-7 (1997)); y neurregulina-4 que une HER4 (Harari *et al.*, *Oncogene* 18:2681-89 (1999)). HB-EGF, betacelulina y epirregulina se unen asimismo a HER4.

Aunque EGF y TGF α no unen HER2, EGF estimula a EGFR y a HER2 a formar un heterodímero, el cual activa EGFR y resulta en transfosforilación de HER2 en el heterodímero. La dimerización y/o transfosforilación parecen activar la tirosina cinasa HER2. Véase Earp *et al.*, *supra*. Análogamente, cuando HER3 se co-expresa con HER2, se forma un complejo de señalización activo, y anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de alterar este complejo (Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20): 14661-14665 (1994)). Adicionalmente, se incrementa la afinidad de HER3 para la herregulina (HRG) a un estado de mayor afinidad cuando se co-expresa con HER2. Véase también, Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995); y Lewis *et al.*, *Cancer Res.*, 56: 1457-1465 (1996) con respecto al complejo de proteínas HER2-HER3. HER4, como HER3, forma un complejo de señalización activo con HER2 (Carraway y Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)).

Para acceder a la ruta de señalización HER, rhuMAb 2C4 (Pertuzumab, OMNITARG™) se desarrolló como un anticuerpo humanizado que inhibe la dimerización de HER2 con otros receptores HER, inhibiendo en esa forma la fosforilación y activación desencadenadas por ligando, y la activación corriente abajo de las rutas RAS y AKT. En un estudio clínico de fase I de Pertuzumab como un agente único para tratar tumores sólidos, se trataron con Pertuzumab 3 pacientes con cáncer avanzado de ovarios. Una tuvo una respuesta parcial duradera, y una paciente adicional tuvo una enfermedad estable durante 15 semanas, Agus *et al.*, *Proc Am. Soc. Clin. Oncol.* 22: 192, Abstract 771 (2003).

Anticuerpos DR5

En el arte se han identificado varios ligandos y receptores pertenecientes a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Incluidos entre tales ligandos

se encuentran el factor alfa de necrosis tumoral ("TNF-alfa"), el factor beta de necrosis tumoral ("TNF-beta" o "linfotóxina-alfa"), linfotóxina-beta ("LT-beta"), ligando CD30, ligando CD27, ligando CD40, ligando OX-40, ligando 4-1BB, LIGHT, ligando Apo-1 (también denominado ligando Fas o ligando CD95), ligando Apo-2 (también denominado Apo2L ó TRAIL), ligando Apo-3 (también denominado TWEAK), APRIL, ligando OPG (también denominado ligando RANK, ODF, o TRANCE), y TALL-1 (también denominado BlyS, BAFF ó THANK) (Véase, *por ejemplo*, Ashkenazi, *Nature Review*, 2:420-430 (2002); Ashkenazi and Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998); Ashkenazi and Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:255-260 (2000); Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997) Wallach, *Cytokine Reference*, Academic Press, 2000, pages 377-411; Locksley *et al.*, *Cell*, 104:487-501 (2001); Gruss and Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Schmid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning *et al.*, *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage *et al.*, *Nature*, 357:80-82 (1992); WO 97/01633 publicada el 16 de enero de 1997; WO 97/25428 publicada el 17 de julio de 1997; Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Chicheportiche *et al.*, *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Hahne *et al.*, *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998); WO98/28426 publicada el 2 de julio de 1998; WO98/46751 publicada el 22 de octubre de 1998; WO/98/18921 publicada el 7 de mayo de 1998; Moore *et al.*, *Science*, 285:260-263 (1999); Shu *et al.*, *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999); Schneider *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999); Mukhopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999)).

La inducción de varias respuestas celulares, mediadas por tales ligandos de la familia TNF, se inicia típicamente por su unión a receptores celulares específicos. Algunos de los ligandos, pero no todos, de la familia TNF se unen a, e inducen diferente actividad biológica a través de, "receptores de muerte" de superficie celular para activar caspasas, o enzimas que llevan a cabo la vía de muerte celular o apoptosis (Salvesen *et al.*, *Cell*, 91:443-446 (1997)). Incluidos entre los miembros de la superfamilia de receptores TNF, identificados hasta la fecha, se encuentran TNFR1, TNFR2, TACI, GITR, CD27, OX-40, CD30, CD40, HVEM, Fas (también denominado Apo-1 o CD95), DR4 (también denominado TRAIL-R1), DR5 (también denominado Apo-2 o TRAIL-R2), DcR1, DcR2, osteoprotegerina (OPG), RANK y Apo-3 (también denominado DR3 o TRAMP).

La mayoría de estos miembros de la familia de receptores TNF comparten la estructura típica de los receptores de superficie celular, incluidas las regiones

extracelulares, de transmembrana e intracelulares, mientras que otros se encuentran naturalmente como proteínas solubles, que carecen de un dominio transmembrana e intracelular. La porción extracelular de los TNFR típicos contiene un patrón repetitivo de secuencia de aminoácidos de múltiples dominios, ricos en cisteína (CRD), que se inician a partir del término NH₂.

El ligando designado como Apo-2L o TRAIL se identificó hace varios años como un miembro de la familia TNF de citocinas, (véase *por ejemplo*, Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12697-12690 (1996); WO 97/01633; WO 97/25428; Patente de los Estados Unidos 5,763,223 expedida el 9 de junio de 1998; Patente de los Estados Unidos 6,284,236 expedida el 4 de septiembre de 2001). El polipéptido Apo2L/TRAIL humano de secuencia natural, de longitud total, es una proteína transmembrana tipo II, de 281 aminoácidos de longitud. Algunas células pueden producir una forma soluble natural del polipéptido, mediante corte proteolítico enzimático de la región extracelular del polipéptido (Mariani *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 137:221-229 (1997)). Estudios cristalográficos de formas solubles de Apo2L/TRAIL revelan una estructura homotrimérica similar a las estructuras de TNF y otras proteínas relacionadas (Hymowitz *et al.*, *Molec. Cell*, 4:563-571 (1999); Cha *et al.*, *Immunity*, 11:253-261 (1999); Mongkolsapaya *et al.*, *Nature Structural Biology*, 6:1048 (1999); Hymowitz *et al.*, *Biochemistry*, 39:633-644 (2000)). Sin embargo, se descubrió que Apo2L/TRAIL, a diferencia de otros miembros de la familia TNF, posee una característica estructural única, en la que tres residuos de cisteína (en la posición 230 de cada subunidad en el homotrímero) coordinan conjuntamente un átomo de zinc, y que la unión de zinc es importante para la estabilidad y actividad biológica del trímero (Hymowitz *et al.*, *supra*; Bodmer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275:20632-20637 (2000)).

Se ha informado en la literatura que Apo2L/TRAIL puede jugar un papel en la modulación del sistema inmunitario, incluidas enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide (véase *por ejemplo*, Thomas *et al.*, *J. Immunol.*, 161:2195-2200 (1998); Johnsen *et al.*, *Cytokine*, 11:664-672 (1999); Griffith *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:1343-1353 (1999); Song *et al.*, *J. Exp. Med.*, 191:1095-1103 (2000)).

Se ha divulgado asimismo que formas solubles de Apo2L/TRAIL inducen apoptosis en una variedad de células cancerosas, incluidos tumores de colon, pulmón, mama, próstata, vejiga, riñón, ovarios y cerebro, así como melanoma, leucemia, y mieloma múltiple (véase *por ejemplo*, Wiley *et al.*, *supra*; Pitti *et al.*,

supra; Patente de los Estados Unidos 6,030,945 expedida el 29 de febrero de 2000; Patente de los Estados Unidos 6,746,668 expedida el 8 de junio de 2004; Rieger *et al.*, *FEBS Letters*, 427:124-128 (1998); Ashkenazi *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 104:155-162 (1999); Walczak *et al.*, *Nature Med.*, 5:157-163 (1999); Keane *et al.*, *Cancer Research*, 59:734-741 (1999); Mizutani *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2605-2612 (1999); Gazitt, *Leukemia*, 13:1817-1824 (1999); Yu *et al.*, *Cancer Res.*, 60:2384-2389 (2000); Chinnaiyan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:1754-1759 (2000)]. Estudios *in vivo* en modelos de tumor murino sugieren además que Apo2L/TRAIL, solo o en combinación con quimioterapia o terapia de radiación, puede ejercer efectos anti-neoplásicos sustanciales (véase *por ejemplo*, Ashkenazi *et al.*, *supra*; Walczak *et al.*, *supra*; Gliniak *et al.*, *Cancer Res.*, 59:6153-6158 (1999); Chinnaiyan *et al.*, *supra*; Roth *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 265:1999 (1999); Solicitud PCT US/00/15512; Solicitud PCT US/01/23691). En contraste con muchos tipos de células cancerosas, la mayoría de los tipos de células humanas normales parecen ser resistentes a la inducción de apoptosis por ciertas formas recombinantes de Apo2L/TRAIL (Ashkenazi *et al.*, *supra*; Walczak *et al.*, *supra*). Jo *et al.* han divulgado que una forma soluble, marcada con polihistidina, de Apo2L/TRAIL indujo apoptosis *in vitro* en hepatocitos humanos aislados normales, más no en hepatocitos no humanos, (Jo *et al.*, *Nature Med.*, 6:564-567 (2000); véase también, Nagata, *Nature Med.*, 6:502-503 (2000)). Se cree que ciertas preparaciones de Apo2L/TRAIL recombinantes pueden variar en términos de propiedades bioquímicas y actividades biológicas en células enfermas versus células normales, dependiendo, por ejemplo, de la presencia o ausencia de una molécula marcadora, el contenido de zinc, y el % de contenido de trímero (véase Lawrence *et al.*, *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:383-385 (2001); Qin *et al.*, *Nature Med.*, Letter to the Editor, 7:385-386 (2001)).

Se ha descubierto que Apo2L/TRAIL une por lo menos cinco receptores diferentes. Por lo menos dos de los receptores, que unen Apo2L/TRAIL, contienen un dominio de muerte celular citoplásmico funcional. Un receptor semejante se ha designado "DR4" (y, alternativamente, TR4 o TRAIL-R1) (Pan *et al.*, *Science*, 276:111-113 (1997); véase también WO98/32856 publicada el 30 de julio de 1998; WO99/37684 publicada el 29 de julio de 1999; WO 00/73349 publicada el 7 de diciembre de 2000; US 6,433,147 expedida el 13 de agosto de 2002; US 6,461,823 expedida el 8 de octubre de 2002, y US 6,342,383 expedida el 29 de enero de 2002).

17 ~~27~~

Otro receptor similar para Apo2L/TRAIL se ha denominado DR5 (alternativamente, se ha designado también Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 ó KILLER (véase, por ejemplo, Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997); Pan *et al.*, *Science*, 277:815-818 (1997); WO98/51793 publicada el 19 de noviembre de 1998; WO98/41629 publicada el 24 de septiembre de 1998; Screatton *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); WO98/35986 publicada el 20 de agosto de 1998; EP870,827 publicada el 14 de octubre de 1998, WO98/46643 publicada el 22 de octubre de 1998; WO99/02653 publicada el 21 de enero de 1999; WO99/09165 publicada el 25 de febrero de 1999, WO99/11791 publicada el 11 de marzo de 1999; US 2002/0072091 publicada el 13 de agosto de 2002; US 2002/0098550 publicada el 7 de diciembre de 2001; US 6,313,269 expedida el 6 de diciembre de 2001; US 2001/0010924 publicada el 2 de agosto de 2001; US 2003/01255540 publicada el 3 de julio de 2003; US 2002/0160446 publicada el 31 de octubre de 2002; US 2002/0048785 publicada el 25 de abril 2002; US 6,342,369 expedida en febrero de 2002; US 6,569,642 expedida el 27 de mayo de 2003; US 6,072,047 expedida el 6 de junio de 2000; US 6,642,358 expedida el 4 de noviembre de 2003; US 6,743,625 expedida el 1 de junio de 2004). Al igual que DR4, se divulga que DR5 contiene un dominio de muerte celular citoplásmico y es capaz de señalar apoptosis tras la unión del ligando (o tras de unir una molécula, tal como un anticuerpo agonista, que imita la actividad del ligando. La estructura cristalina del complejo formado entre Apo-2L/TRAIL y DR5 se describe en Hymowitz *et al.*, *Molecular Cell*, 4:563-571 (1999).

Luego de la unión del ligando, los dos DR4 y DR5 pueden desencadenar apoptosis independientemente, reclutando y activando el iniciador de apoptosis, caspasa-8, a través de la molécula de adaptador que contiene el dominio de muerte celular, denominado FADD/Mort1 (Kischkel *et al.*, *Immunity*, 12:611-620 (2000); Sprick *et al.*, *Immunity*, 12:599-609 (2000); Bodmer *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2:24:1-24:3 (2000)).

Se ha divulgado que Apo2L/TRAIL une también aquellos receptores designados DcR1, DcR2 y OPG, los cuales se cree que funcionan como inhibidores, más bien que como transductores de señalización (véase, por ejemplo, DCR1 (también de nominado TRID, LIT o TRAIL-R3) (Pan *et al.*, *Science*, 276:111-113 (1997); Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997); McFarlane *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:25417-25420 (1997); Schneider *et al.*, *FEBS Letters*, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti *et al.*, *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997); y

Mongkolsapaya *et al.*, *J. Immunol.*, 160:3-6 (1998); DcR2 (llamado igualmente TRUNDD ó TRAIL-R4) (Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997); Pan *et al.*, *FEBS Letters*, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti *et al.*, *Immunity*, 7:813-820 (1997), y OPG. En contraste con DR4 y DR5, los receptores DcR1 y DcR2 no señalizan apoptosis.

Algunos anticuerpos que se unen a los receptores DR4 y/o DR5 se han divulgado en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos anti-DR4 dirigidos al receptor DR4 y que poseen actividad agonística o apoptótica en ciertas células mamíferas se describen en, por ejemplo, WO 99/37684 publicada el 29 de julio de 1999, WO 00/73349 publicada el 12 de julio de 2000; WO 03/066661 publicada el 14 de agosto de 2003. Véase, además, por ejemplo, Griffith *et al.*, *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Chuntharapai *et al.*, *J. Immunol.*, 166:4891-4898 (2001); WO 02/097033 publicada el 2 de diciembre de 2002; WO 03/042367 publicada el 22 de mayo de 2003; WO 03/038043 publicada el 8 de mayo de 2003; WO 03/037913 publicada el 8 de mayo de 2003. Igualmente, se han descrito ciertos anticuerpos anti-DR5, véase, por ejemplo, WO 98/51793 publicada el 8 de noviembre de 1998; Griffith *et al.*, *J. Immunol.*, 162:2597-2605 (1999); Ichikawa *et al.*, *Nature Med.*, 7:954-960 (2001); Hylander *et al.*, "An Antibody to DR5 (TRAIL-Receptor 2) Suppresses the Growth of Patient Derived Gastrointestinal Tumors Grown in SCID mice", Abstract, 2d International Congress on Monoclonal Antibodies in Cancers, Aug. 29-Sept. 1, 2002, Banff, Alberta, Canada; WO 03/038043 publicada el 8 de mayo de 2003; WO 03/037913 publicada el 8 de mayo de 2003. Además, se han descrito ciertos anticuerpos con reactividad cruzada frente a los dos receptores, DR4 y DR5 (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos 6,252,050 expedida el 26 de junio de 2001).

Sumario de la Invención

La invención en esta solicitud se refiere, por lo menos en parte, a la identificación de acetato de histidina, pH 5.5 a 6.5, como un amortiguador particularmente útil para formular anticuerpos monoclonales, especialmente anticuerpos IgG1 de longitud total, los cuales son susceptibles a desamidación y/o agregación. La formulación retarda la degradación del producto anticuerpo en ella.

En consecuencia, en un primer aspecto, la invención concierne a una formulación farmacéutica estable, que comprende un anticuerpo monoclonal en amortiguador de acetato de histidina, pH 5.5 a 6.5. El anticuerpo monoclonal

preferiblemente uno un antígeno seleccionado del grupo conformado por HER2, CD20, DR5, BR3, IgE, y VEGF.

Adicionalmente, la invención concierne a un método de tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar la formulación a un sujeto en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad o trastorno.

En otro aspecto, la invención concierne a una formulación farmacéutica que comprende: (a) un anticuerpo IgG1 de longitud total susceptible a desamidación o agregación en una cantidad desde alrededor de 10mg/mL a alrededor de 250mg/mL; (b) amortiguador de acetato de histidina, pH 5.5 a 6.5; (c) sacárido seleccionado del grupo conformado por trehalosa y sacarosa, en una cantidad desde alrededor de 60mM a alrededor de 250mM; y (d) polisorbato 20 en una cantidad desde alrededor de 0.01% a alrededor de 0.1%.

La invención provee asimismo un método para reducir la desamidación o agregación de un anticuerpo monoclonal terapéutico, que comprende formular el anticuerpo en un amortiguador de acetato de histidina, pH 5.5 a 6.5.

En todavía un aspecto adicional, la invención concierne a una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une al dominio II de HER2 en un amortiguador de histidina con un pH desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5, un sacárido y un surfactante.

La invención se refiere también a una formulación farmacéutica que comprende Pertuzumab en una cantidad desde alrededor de 20mg/mL a alrededor de 40mg/mL, amortiguador de acetato de histidina, sacarosa, y polisorbato 20, en donde el pH de la formulación es desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5.

La invención corresponde asimismo a una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo DR5 en un amortiguador de histidina con un pH desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5, un sacárido, y un surfactante.

En otro aspecto, la invención concierne a una formulación farmacéutica que comprende Apomab en una cantidad desde alrededor de 10mg/mL a alrededor de 30mg/mL, amortiguador de acetato de histidina, trehalosa, y polisorbato 20, en donde el pH de la formulación es desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5.

En todavía otro aspecto, la invención provee un método de tratar cáncer en un sujeto, que comprende administrar la formulación farmacéutica al sujeto en una cantidad efectiva para tratar el cáncer.

La invención concierne a un frasquito con un tapón perforable por una jeringa o un recipiente de acero inoxidable, que comprende la formulación dentro del frasquito o recipiente, opcionalmente en forma congelada. Más aún, la

invención provee un método de elaborar una formulación farmacéutica que comprende: (a) preparar la formulación de anticuerpo monoclonal; y (b) evaluar la estabilidad física, la estabilidad química, o actividad biológica del anticuerpo monoclonal de la formulación.

Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1 ilustra los Dominios I-IV (SEQ ID Nos.19-22, respectivamente) del dominio extracelular de HER2.

Figuras 2A y 2B ilustran las alineaciones de las secuencias de aminoácidos de los dominios ligeros variables (V_L) (Fig. 2A) y pesados variables (V_H) (Fig. 2B) del anticuerpo monoclonal murino 2C4 (SEQ ID Nos. 1 y 2, respectivamente); dominios V_L y V_H de la versión 574 de 2C4 humanizado (SEQ ID Nos. 3 y 4, respectivamente), y las estructuras alternas ("**frameworks**") de consenso V_L y V_H humanas (hum $\kappa 1$, subgrupo I kappa ligero; humIII, subgrupo III pesado) (SEQ ID Nos. 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican diferencias entre la versión 574 de 2C4 humanizado y el anticuerpo monoclonal 2C4 murino o entre la versión 574 de 2C4 humanizado y la estructura alterna humana. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) se encuentran entre paréntesis.

Figuras 3A y 3B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada de Pertuzumab (SEQ ID Nos. 15 y 16, respectivamente). Las CDR se muestran en negrilla. La masa molecular calculada de la cadena ligera y la cadena pesada son 23.526,22 Da y 49.216,56 Da (cisternas en forma reducida). La fracción carbohidrato se une a Asn 299 de la cadena pesada.

Figuras 4A y 4B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada de Pertuzumab, incluyendo cada una secuencia peptídica señal aminoterminal intacta (SEQ ID Nos. 17 y 18, respectivamente).

Figura 5 ilustra, esquemáticamente, la unión de 2C4 en el sitio heterodimérico de unión de HER2, previniendo en esa forma la heterodimerización con EGFR o HER3 activados.

Figura 6 ilustra el acoplamiento de HER2/HER3 a las rutas MAPK y Akt.

Figura 7 compara las actividades de Trastuzumab y Pertuzumab.

Figura 8 ilustra la estabilidad de la formulación de Pertuzumab mediante análisis de intercambio iónico (IEX).

Figura 9 muestra la estabilidad de la formulación de Pertuzumab mediante análisis de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC).

Figura 10 refleja la estabilidad física de Pertuzumab en diferentes formulaciones.

Figura 11 es de un estudio de agitación de formulaciones líquidas de Pertuzumab.

Figura 12 es de otro estudio de agitación de formulaciones líquidas de Pertuzumab.

Figura 13 es de un estudio de congelamiento-descongelamiento de una formulación de Pertuzumab.

Figuras 14A y 14B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID No. 13) y la cadena pesada (SEQ ID No. 14) de Trastuzumab.

Figuras 15A y 15B ilustran una secuencia variante de cadena ligera (SEQ ID No. 23) de Pertuzumab y una secuencia variante de cadena pesada (SEQ ID No. 24) de Pertuzumab.

Figura 16A y 16B muestra estructuras de oligosacáridos observadas comúnmente en anticuerpos IgG.

Figuras 17A y 17B muestran las secuencias de las cadenas ligeras y pesadas (SEQ ID Nos. 37-44) de anticuerpos anti-IgE específicos E25, E26, HAE1 y Hu-901. En Fig. 17A, el dominio ligero variable termina con los residuos VEIK, alrededor del residuo 111. En Fig. 17B, el dominio pesado variable termina con los residuos VTVSS, alrededor del residuo 120.

Figura 18A es una alineación de secuencias que compara las secuencias de aminoácidos del dominio ligero variable (V_L) de cada uno de 2H7 murino (SEQ ID No. 25), la variante 2H7v16 humanizada (SEQ ID No. 26), y el subgrupo I de cadena ligera kappa humano (SEQ ID No. 27). Las CDR de V_L de 2H7 y hu2H7v16 son las siguientes: CDRI (SEQ ID No. 57), CDR2 (SEQ ID No. 58), y CDR3 (SEQ ID No. 59).

Figura 18B es una alineación de secuencias que compara las secuencias de aminoácidos del dominio pesado variable (V_H) de cada uno de 2H7 murino (SEQ ID No. 28), la variante 2H7v16 humanizada (SEQ ID No. 29), y la secuencia consenso humana del subgrupo III de cadena pesada (SEQ ID No. 30). Las CDR de V_H de 2H7 y hu2H7v16 son las siguientes: CDRI (SEQ ID No. 60), CDR2 (SEQ ID No. 61), y CDR3 (SEQ ID No. 62).

En Fig. 18A y Fig. 18B, las CDRI, CDR2 y CDR3 en cada cadena se encierran entre paréntesis, flanqueadas por las regiones de estructura alterna de anticuerpo, FR1-FR4, como se indica. 2H7 se refiere al anticuerpo 2H7 murino. Los asteriscos entre dos filas de secuencias indican las posiciones que son

diferentes entre las dos secuencias. La numeración de los residuos es de acuerdo con Kabat *et al.* Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), con inserciones ilustradas como a, b, c, d, y e.

Figura 19 ilustra secuencias de dominio variable de tres diferentes anticuerpos VEGF con SEQ ID Nos. 31- 36.

Figura 20 muestra el perfil de elución por cromatografía de exclusión de tamaño de las siguientes muestras Apomab: (a) control y formulaciones preparadas con (b) pH 4.0, (c) pH 5.0, (d) pH 6.0 y (e) pH 7.0. Las muestras formuladas se almacenaron a 40°C durante 2 meses antes del análisis.

Figura 21 ilustra el perfil de la tasa de pH para la pérdida en monómero del anticuerpo Apomab durante el almacenamiento. La cinética del monómero mediante SEC se monitoreó durante el almacenamiento a 30°C y 40°C, y se calcularon las constantes de tasa de primer orden.

Figura 22 presenta el perfil de elución de cromatografía de intercambio iónico (IEC) de muestras de Apomab en la siguiente forma: (a) control y formulaciones preparadas con (b) pH 4.0, (c) pH 5.0, (d) pH 6.0 y (e) pH 7.0. Las muestras formuladas se almacenaron a 40°C durante 2 meses antes del análisis.

Figura 23 muestra el perfil de tasa de pH para la pérdida en el pico principal de IEC durante el almacenamiento. La cinética de pico principal por IEC se monitoreó durante el almacenamiento a 30°C y 40°C, y se calcularon las constantes de tasa de primer orden.

Figura 24 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc del ligando Apo-2 humano (SEQ ID No. 45) y su secuencia derivada de aminoácidos (SEQ ID No. 46). La "N" en la posición de nucleótido 447 (en SEQ ID No. 45) se usa para indicar que la base del nucleótido puede ser una "T" o "G".

Figuras 25 A y 25B muestran la secuencia de 411 aminoácidos del receptor DR5 humano (SEQ ID No.47) como se publica en WO 98/51793 el 19 de noviembre de 1998, y la secuencia nucleotídica codificante (SEQ ID No. 48).

Figuras 26A y 26B muestran la secuencia de 440 aminoácidos del receptor DR5 humano (SEQ ID No. 49) y la secuencia nucleotídica codificante (SEQ ID No. 50), como también se publica en WO 98/35986 el 20 de agosto de 1998.

Figura 27 es la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de Apomab 7.3 (SEQ ID No. 51).

Figura 28 es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de Apomab 7.3 (SEQ ID No.52).

Figuras 29 muestran la alineación de la cadena pesada 16E2 (SEQ ID No. 53) y las secuencias de aminoácidos de cadena pesada 7.3 (SEQ ID No. 51) de Apomab.

Figura 30 muestra la alineación las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera 16E2 (SEQ ID No. 54) y la cadena ligera de Apomab 7.3 (SEQ ID No. 52).

Figuras 31A y 31B ilustran la secuencia de aminoácidos pesada variable (Fig. 31A; SEQ ID No. 55) y la secuencia de aminoácidos ligera variable (Fig. 31B; SEQ ID No. 56) de Apomab 7.3. Los residuos de CDR se identifican en negrilla.

Figura 32 muestra una alineación de las cadenas ligeras de 2H7v16 y 2H7v511 maduras (SEQ ID Nos. 63 y 64, respectivamente). Las secuencias se muestran con la numeración de residuos de dominio variable de Kabat y la numeración de residuos de dominio constante Eu.

Figura 33 muestra una alineación de las cadenas pesadas maduras 2H7v16 y 2H7v511 (SEQ ID Nos. 65 y 66, respectivamente). Las secuencias se muestran con la numeración de residuos de dominio variable de Kabat y la numeración de residuos de dominio constante Eu.

Descripción Detallada de las Incorporaciones Preferidas

I. Definiciones

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma como para permitir que la actividad biológica del ingrediente activo sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos a un sujeto, al cual se administraría la formulación. Tales formulaciones son estériles.

Una "formulación estéril" es aséptica o libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

En esta solicitud, una formulación "congelada" es una formulación a una temperatura por debajo de 0° C. Generalmente, la formulación congelada no se seca por congelamiento, ni se somete a liofilización previa o subsiguiente. Preferiblemente, la formulación congelada comprende una sustancia farmacéutica congelada para almacenamiento (en un recipiente de acero inoxidable) o un producto farmacéutico congelado (en configuración de frasco final).

Una la formulación "estable" es una en la cual la proteína contenida en ella conserva esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica luego del almacenamiento. Preferiblemente, la formulación conserva

esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica luego del almacenamiento. El período de almacenamiento se selecciona generalmente basándose en la semivida prevista de la formulación. En el arte se dispone de varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de una proteína y se reseñan en 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), por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo elegido. Preferiblemente, la formulación es estable a alrededor de 40°C durante por lo menos alrededor de 2-4 semanas, y/o estable a alrededor de 5°C y/o 15°C durante por lo menos 3 meses, y/o estable a alrededor de -20°C durante por lo menos 3 meses o por lo menos 1 año. Más aún, la formulación es preferiblemente estable luego del congelamiento (a, por ejemplo, -70°C) y descongelamiento de la formulación, por ejemplo luego de 1, 2 ó 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento. La estabilidad puede evaluarse cualitativa y/o cuantitativamente en una variedad de diferentes modos, incluida la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo usando cromatografía de exclusión de tamaño, mediante la turbiedad, y/o mediante inspección visual); evaluando la heterogeneidad de carga utilizando cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis de zona capilar; análisis de secuencias amino-terminales o carboxi-terminales; análisis espectrométrico de masas; análisis SDS-PAGE para comparar anticuerpo reducido e intacto; análisis de mapa peptídico (por ejemplo tríptico o LYS-C); evaluando la actividad biológica o la función de unión a antígeno del anticuerpo; etc. La inestabilidad puede involucrar una cualquiera o más de: agregación, desamidación (por ejemplo, desamidación Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación Met), isomerización (por ejemplo, isomerización Asp), corte/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de unión flexible), formación de succinimida, cisteína(s) no pareada, extensión N-terminal, procesamiento C-terminal, diferencias de glucosilación, etc. En esta solicitud, un anticuerpo monoclonal "desamidado" es uno en el cual uno o más residuos asparagina del mismo se han derivado, por ejemplo, a un ácido aspártico o a un ácido iso-aspártico.

Un anticuerpo que es "susceptible a desamidación" es uno que comprende uno o más residuos, que se ha descubierto que son propensos a desamidarse.

Un anticuerpo que es "susceptible a agregación" es uno que se ha descubierto que se agrega con otra molécula(s) de anticuerpo, especialmente luego del congelamiento y/o agitación.

Un anticuerpo que es "susceptible a fragmentación" es uno que se ha descubierto que se corta proteolíticamente en dos o más fragmentos, por ejemplo en una región de unión flexible del mismo.

Por "desamidación reductora, agregación, o fragmentación" se quiere dar a entender prevenir o disminuir la cantidad de desamidación, agregación, o fragmentación relativa al anticuerpo monoclonal formulado con un pH diferente o en un amortiguador diferente.

En esta solicitud, "actividad biológica" de un anticuerpo monoclonal se refiere a la capacidad del anticuerpo de unirse a antígeno y resultar en una respuesta biológica cuantificable, la cual puede medirse *in vitro* o *in vivo*. Tal actividad puede ser antagonística (por ejemplo donde el anticuerpo es un anticuerpo HER2) o agonística (por ejemplo, donde el anticuerpo une DR5). En el caso de Pertuzumab, en una incorporación, la actividad biológica se refiere a la capacidad del anticuerpo formulado de inhibir la proliferación de la línea celular MDA-MB-175-VII de cáncer de mama humano. Donde el anticuerpo es Apomab, la actividad biológica puede referirse, por ejemplo, a la capacidad del anticuerpo formulado de eliminar las células Colo205 del carcinoma del colon.

Por "isotónica" se quiere significar que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica desde alrededor de 250 a 350mOsm. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro tipo presión de vapor o congelamiento con hielo, por ejemplo.

Tal como se emplea en esta solicitud, "amortiguador" se refiere a una solución amortiguada que resiste cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El amortiguador de esta invención tiene preferiblemente un pH en el rango desde alrededor de 5.0 a alrededor de 7.0, preferiblemente desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5, por ejemplo desde alrededor de 5.8 a alrededor de 6.2 y, muy preferiblemente, tiene un pH de alrededor de 6.0. Ejemplos de amortiguadores que controlarán el pH en este rango incluyen acetato, succinato, gluconato, histidina, citrato, glicilglicina y otros amortiguadores ácidos orgánicos. El amortiguador preferido en esta solicitud es un amortiguador de histidina.

Un "amortiguador de histidina" es un amortiguador que comprende iones de histidina. Ejemplos de amortiguadores de histidina incluyen cloruro de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina. Se descubrió que el amortiguador de histidina preferido identificado en los ejemplos en esta solicitud es

el acetato de histidina. En la incorporación preferida, el amortiguador de acetato de histidina se prepara valorando volumétricamente L-histidina (base libre, sólido) con ácido acético (líquido). Preferiblemente, el amortiguador de histidina o amortiguador de acetato de histidina está en un pH 5.5 a 6.5, preferiblemente pH 5.8 a 6.2.

Un "sacárido" en esta solicitud comprende la composición general $(CH_2O)_n$ y sus derivados, incluidos monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alcoholes de azúcar, azúcares reductores, azúcares no reductores, etc. Ejemplos de sacáridos en esta solicitud incluyen glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrina, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitól, silitol, sorbitol, manitol, melibiosa, melezitosa, rafinosa, mannotriosa, estaquiosa, maltosa, lactulosa, maltulosa, glucitol, maltitol, lactitol, iso-maltulosa, etc. El sacárido preferido en esta solicitud es un disacárido no reductor, tal como trehalosa o sacarosa.

En esta solicitud, un "surfactante" se refiere a un agente tenso-activo, preferiblemente un surfactante no iónico. Ejemplos de surfactantes en esta solicitud incluyen polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80); poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; dodecilsulfato de sodio (SDS); laurel sulfato de sodio; octil-glucósido de sodio; 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 ejemplo lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-dimetilamina; metil cocoiltaurato sódico, o metil oleil-taurato disódico; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey); polietil glicol, polipropil glicol, y copolímeros de etilen y propilen glicol (por ejemplo, Pluronics, PF68 etc); etc. El surfactante preferido en esta solicitud es polisorbato 20.

Un "receptor HER" es una proteína tirosina cinasa de receptor que pertenece a la familia de receptores HER e incluye los receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4 y otros miembros de esta familia a identificarse en el futuro. El receptor HER comprenderá generalmente un dominio extracelular, que puede unir un ligando HER; un dominio lipófilo de transmembrana; un dominio tirosina cinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo-terminal que alberga varios residuos de tirosina, los cuales pueden fosforilarse.

Preferiblemente el receptor HER une el receptor HER humano de secuencia natural.

El dominio extracelular de HER2 comprende cuatro dominios, Dominio I (residuos de aminoácidos desde alrededor de 1-195), Dominio II (residuos de aminoácidos desde alrededor de 196-320), Dominio III (residuos de aminoácidos desde alrededor de 321- 488), y Dominio IV (residuos de aminoácidos desde alrededor de 489-632) (numeración de residuos sin péptido señal). Véase Garrett *et al.*, *Mol. Cell.*, 11: 495-505 (2003), Cho *et al.*, *Nature* 421 : 756-760 (2003), Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5:317-328 (2004), o Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993). Véase también Fig. 1 en esta solicitud.

Los términos "ErbB1", "HER1", "receptor de factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se emplean indistintamente en esta solicitud y se refieren a EGFR como se divulga, por ejemplo, en Carpenter *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), incluidas sus formas mutantes de ocurrencia natural (*por ejemplo*, un EGFR mutante de delección como en Humphrey *et al.*, *PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)). *erbB1* se refiere al gen que codifica el producto proteína EGFR.

Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se emplean indistintamente en esta solicitud y se refieren a la proteína HER2 humana, descrita por ejemplo en Semba *et al.*, *PNAS (USA)*, 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto *et al.*, *Nature*, 319:230-234 (1986) (número de acceso a Genbank X03363). El término "*erbB2*" se refiere al gen que codifica el ErbB2 humano y "*neu*" se refiere al gen que codifica p185^{neu} de rata. El HER2 preferido es HER2 humano de secuencia natural.

"ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor como se divulga, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,183,884 y 5,480,968, así como Kraus *et al.*, *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989).

Los términos "ErbB4" y "HER4" en esta solicitud se refieren al polipéptido receptor como se divulga, por ejemplo, en la Solicitud de Patente EP No. 599,274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993), incluidas sus isoformas, *por ejemplo*, como se divulga en WO 99/19488, publicada el 22 de abril de 1999.

Por "ligando HER" se da a entender un polipéptido que se une a un receptor HER y/o lo activa. El ligando HER de particular interés en esta solicitud es un ligando HER humano de secuencia natural tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage *et al.*, *J. Biol. Chem.* 247:1612-1621 (1972)); factor α

de crecimiento transformante (TGF- α) (Marquardt *et al.*, *Science* 223:1079-1082 (1984)); anfirregulina también conocida como schwanoma o factor de crecimiento autocrino de queratinocitos (Shoyab *et al.*, *Science* 243: 1074-1076 (1989); Kimura *et al.*, *Nature* 348:257-260 (1990); y Cook *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing *et al.*, *Science* 259:1604-1607 (1993); y Sasada *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 1173 (1993)); factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama *et al.*, *Science* 251:936-939 (1991)); epirregulina (Toyoda *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995); y Komurasaki *et al.*, *Oncogene* 15:2841-2848 (1997)); una herregulina (véase más adelante); neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway *et al.*, *Nature* 387:512-516 (1997)); neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567 (1997)); neurregulina-4 (NRG-4) (Harari *et al.*, *Oncogene* 18:2681-89 (1999)) o cripto (CR-1) (Kannan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997)). Los ligandos HER que unen EGFR incluyen EGF, TGF- α , anfirregulina, betacelulina, HB-EGF y epirregulina. Los ligandos HER que unen HER3 incluyen herregulinas. Ligandos HER capaces de unir HER4 incluyen betacelulina, epirregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y herregulinas.

"Herregulina" (HRG), cuando se emplea en esta solicitud, se refiere a un polipéptido codificado por el producto génico herregulina como se divulga en la Patente de los Estados Unidos No. 5,641,869 o Marchionni *et al.*, *Nature* 362:312-318 (1993). Ejemplos de herregulinas incluyen herregulina- α , herregulina- β 1, herregulina- β 2 y herregulina- β 3 (Holmes *et al.*, *Science* 256:1205-1210 (1992); y Patente de los Estados Unidos No. 5,641,869); factor de diferenciación *neu* (NDF) (Peles *et al.*, *Cell* 69: 205-216 (1992)); actividad inductora de receptor acetilcolina (ARIA) (Falls *et al.*, *Cell* 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento glial (GGFs) (Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993)); factor derivado de neuronas motoras y sensoriales (SMDF) (Ho *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)); y-herregulina (Schaefer *et al.*, *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997)). El término incluye fragmentos biológicamente activos y variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido HRG de secuencia natural, tal como su fragmento de dominio tipo EGF (*por ejemplo*, HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄).

Un "dímero HER" en esta solicitud es un dímero no covalentemente asociado, que comprende por lo menos dos diferentes receptores HER. Tales complejos pueden formarse cuando una célula, que expresa dos o más receptores HER, se expone a un ligando HER y puede aislarse por inmunoprecipitación y analizarse por SDS-PAGE como se describe en Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*,

29 36

269(20):14661-14665 (1994), por ejemplo. Ejemplos de tales dímeros HER incluyen los heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 y HER3-HER4. Más aún, el dímero HER puede comprender dos o más receptores HER2, combinados con un receptor HER diferente, tal como HER3, HER4 o EGFR. Otras proteínas, tales como la subunidad de receptor de citosina (por ejemplo, gp130) pueden asociarse con el dímero.

Un "sitio heterodimérico de unión" en HER2, se refiere a una región en el dominio extracelular de HER2 que contacta, o interactúa con, una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4, luego de la formación de un dímero con ella. La región se encuentra en Dominio II de HER2, Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

"Activación de HER" o "activación de HER2" se refiere a la activación, o fosforilación, de uno cualquiera o más receptores HER, o receptores HER2. Generalmente, la activación de HER resulta en transducción de señales (por ejemplo, la causada por un dominio cinasa intracelular de un receptor HER, que fosforila residuos de tirosina en el receptor HER o un polipéptido sustrato). La activación de HER puede estar mediada por la unión de ligando HER a un dímero HER, que comprende el receptor HER de interés. La unión de ligando HER a un dímero HER puede activar un dominio cinasa de uno o más de los receptores HER en el dímero y, por consiguiente, resulta en la fosforilación de residuos de tirosina en uno o más de los receptores HER y/o fosforilación de residuos de tirosina en polipéptido(s) sustrato(s) adicional(es), tales como cinasas intracelulares Akt o MAPK.

El término "anticuerpo" en esta solicitud se emplea en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales de longitud total, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos) formados, por lo menos, de dos anticuerpos de longitud total, y fragmentos de anticuerpo, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada.

El término "anticuerpo monoclonal", como se emplea en esta solicitud, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es *decir*, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos y/o unen el mismo epítipo, excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando tales variantes generalmente presentes en cantidades menores. En contraste con preparaciones de anticuerpo policlonal que, típicamente, incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo

monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en el sentido de que pueden sintetizarse incontaminados por otras inmunoglobulinas. El calificativo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no tiene que interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse por el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden elaborarse por métodos de ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, Patente de los Estados Unidos 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también de bibliotecas de anticuerpos en bacteriófagos, usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en esta solicitud incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos", en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con, u homóloga a, secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular, o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena (s) es idéntico con, u homólogo a, secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie, o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos 4,816,567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855(1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en esta solicitud incluyen anticuerpos "primatizados", que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable, derivados de un primate no humano (*por ejemplo*, mono del Viejo Mundo o macaco) y secuencias de región constante humanas.

"Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de cadena total, que contiene preferiblemente su región variable o de unión a antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmento(s) de anticuerpo.

Un "anticuerpo de longitud total" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo,

dominios constantes de secuencia natural humana) o sus variantes de secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, el anticuerpo de longitud total tiene una o más funciones efectoras.

El término "anticuerpo de especie principal" en esta solicitud se refiere a una estructura de anticuerpo en una composición, que es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición. En una incorporación, el anticuerpo de especie principal es un anticuerpo HER2, tal como un anticuerpo que se une al Dominio II de HER2, anticuerpo que inhibe la dimerización de HER más efectivamente que Trastuzumab, y/o un anticuerpo que se une a un sitio heterodimérico de unión de HER2. La incorporación preferida en esta solicitud de un anticuerpo HER2 de especie principal es uno que comprende las secuencias de aminoácidos variables ligeras y pesadas variables en SEQ ID Nos. 3 y 4 y, muy preferiblemente que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada en SEQ ID Nos. 15 y 16 (Pertuzumab).

Una "variante de secuencia de aminoácidos" en esta solicitud es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que difiere de un anticuerpo de especie principal. Ordinariamente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán por lo menos alrededor de 70% de homología con el anticuerpo de especie principal y, preferiblemente, serán por lo menos alrededor de 80%, más preferiblemente por lo menos alrededor de 90% homólogas con el anticuerpo de especie principal. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones, y/o adiciones en ciertas posiciones en, o adyacentes, a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de especie principal. Ejemplos de variantes de secuencia de aminoácidos en esta solicitud incluyen variante ácida (por ejemplo, variante de anticuerpo desamidado), variante básica, el anticuerpo con una extensión líder amino-terminal (por ejemplo, VHS-) en una o dos de sus cadenas ligeras, anticuerpo con un residuo lisina C-terminal en una o dos de sus cadenas pesadas, etc, e incluye combinaciones de variaciones a las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y/o ligeras. La variante del anticuerpo de particular interés en esta solicitud es el anticuerpo que comprende una extensión líder amino-terminal en una o más de sus cadenas ligeras, comprendiendo además, en forma opcional, otras diferencias de secuencia de aminoácidos y/o glucosilación, relativas al anticuerpo de especie principal.

Un "anticuerpo monoclonal terapéutico" es un anticuerpo usado para terapia de un sujeto humano. Anticuerpos monoclonales terapéuticos divulgados en esta solicitud incluyen: anticuerpos HER2 para el cáncer y varias enfermedades o

trastornos no malignos; anticuerpos CD20 o BR3 para terapias de neoplasias malignas de linfocitos B, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de injertos, o bloqueo de una respuesta inmunitaria a un antígeno extraño; anticuerpos IgE para terapia de un trastorno mediado por IgE; anticuerpos DR5 o VEGF para terapia contra el cáncer.

Un anticuerpo de "variante de glucosilación" en esta solicitud es un anticuerpo con una o más fracciones carbohidrato unidas a él, que difieren de una o más fracciones carbohidrato unidas a un anticuerpo de especie principal. Ejemplos de variantes de glucosilación en esta solicitud incluyen un anticuerpo con una estructura oligosacárido G1 o G2, en vez de una estructura de oligosacárido GO, unida a una región Fc del mismo, un anticuerpo con una o más fracciones carbohidrato unidas a una o dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo sin un carbohidrato unido a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc, y combinaciones de alteraciones de glicosilación.

Donde el anticuerpo tiene una región Fc, una estructura oligosacárido, tal como la mostrada en Fig. 16 en esta solicitud, puede unirse a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo, en el residuo 299 (298, numeración Eu de residuos). Para Pertuzumab, GO fue la estructura oligosacárido predominante, encontrándose otras estructuras oligosacárido tales como GO-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) y G2 en cantidades menores en la composición Pertuzumab.

A menos que se indique lo contrario, una "estructura oligosacárido G1" en esta solicitud incluye las estructuras G-1, G1-1, G1(1-6) y G1(1-3).

Una "extensión líder amino-terminal" en esta solicitud se refiere a uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia líder amino-terminal, que están presentes en el término amino de una cualquiera o más cadenas pesadas o ligeras de un anticuerpo. Una extensión líder amino-terminal ejemplar comprende o consta de tres residuos de aminoácidos, VHS, presentes en una o ambas cadenas ligeras de una variante de anticuerpo.

"Homología" se define como el porcentaje de residuos en la variante de secuencia de aminoácidos, que son idénticos luego de alinear las secuencias e introducir vacíos ("**gaps**"), si es necesario, para lograr la homología porcentual máxima. Métodos y programas de computador para la alineación son bien conocidos en el arte. Un programa similar de computador es "Align 2," creado por Genentech, Inc., y radicado con documentación de usuario ante la Oficina de los

Estados Unidos de Derechos de Autor, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

"Funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o región FC variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen unión C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión de receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, anticuerpos de longitud total pueden asignarse a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos de longitud total: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas pueden subdividirse aún más en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Son bien conocidas las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

"Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células, en la cual células citotóxicas no específicas, que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos), reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, causan lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar ADCC, los linfocitos NK, expresan únicamente Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch *et al.*, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,500,362 o 5,821,337. Células efectoras útiles para tales ensayos 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 ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR 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 (NK). Las células efectoras pueden aislarse de una fuente natural de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe en esta solicitud.

Los términos "receptor Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Más aún, un FcR preferido es uno que une un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluidas sus variantes alélicas y, alternativamente, formas empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), los cuales poseen 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 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). Los FcR se reseñan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et. al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et. al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, 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 IgG maternas al feto. Guyer *et. al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et. al.*, *J. Immunol* 24:249 (1994).

"Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula de descomponer por lisis una diana, en la presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema complemento (C1q) a una molécula (*por ejemplo*, un anticuerpo) acompañado con un antígeno afín. Para evaluar la activación de complemento, puede realizarse un análisis CDC, *por ejemplo*, como se describe en Gazzano-Santoro *et. al.*, *J. Immunol Methods* 202:163 (1996).

"Anticuerpos nativos" son usualmente glucoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de

enlazamientos disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena ligera y pesada posee también puentes disulfuro intracadena, regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H), seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. No obstante, la variabilidad no está uniformemente distribuida a través de los dominios variables de los anticuerpos. Ésta se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena pesada como en los de cadena ligera. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones de estructura alterna (FR) ("**the framework regions (FRs)**"). Los dominios variables de cadenas naturales pesada y ligera comprenden cada una cuatro FR que adoptan en gran medida una configuración de hoja β (" **β -sheet configuration**"), conectada por tres regiones hipervariables, que forman lazos 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 FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *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 unir un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en citotoxicidad celular, dependiente de anticuerpo (ADCC).

El término "región hipervariable", cuando se emplea en esta solicitud, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de

cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "lazo hipervariable" (*por ejemplo*, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Residuos de "región de estructura alterna" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de región hipervariable, como se definen en esta solicitud.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizarse rápidamente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que posee dos sitios de unión a antígeno y es aún capaz de enlazar cruzadamente antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo, que contiene un sitio completo de unión a antígeno y reconocimiento de antígeno. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. No obstante, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir antígeno, si bien con una afinidad más baja que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab contiene igualmente el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el término carboxi del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región de unión flexible del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en esta solicitud para Fab', en el cual el residuo(s) de cisteína de los dominios constantes lleva por lo menos un grupo tiol libre. Fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpo se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab', que tienen cisteínas de unión flexible entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo son también conocidos.

Las "cadenas livianas" de anticuerpos de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L , que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una reseña del scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, páginas 269-315(1994). Los fragmentos scFv del anticuerpo HER2 se describen en WO93/16185; Patente de los Estados Unidos No. 5,571,894; y Patente de los Estados Unidos No. 5,587,458.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, los cuales fragmentos comprenden un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio variable ligero (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo recipiendario), en las cuales residuos de una región hipervariable del recipiendario se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región de estructura alterna (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Más aún, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos, que no se encuentran en el anticuerpo recipiendario ni en anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar aún más el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá

sustancialmente la totalidad de por lo menos uno y, típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente todos los lazos hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá también por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para mayores detalles, véase Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Anticuerpos HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o Trastuzumab (HERCEPTIN®) como se describe en la Tabla 3 de la Patente de los Estados Unidos 5,821,337 expresamente incorporada en esta solicitud por referencia; los anticuerpos 520C9 humanizados (WO93/21319) y 2C4 humanizado, como se describe en esta solicitud.

Para los propósitos de esta solicitud, "Trastuzumab," "HERCEPTIN®," y "huMAb4D5-8" se refieren a un anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada en SEQ ID NOS. 13 y 14, respectivamente.

En esta solicitud, "Pertuzumab," "rhuMAb2C4," y "OMNITARG™" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos ligeras variables y pesadas variables en SEQ ID Nos. 3 y 4, respectivamente. Donde Pertuzumab es un anticuerpo de longitud total, éste preferiblemente comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada en SEQ ID NOS. 15 y 16, respectivamente.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo (como se define en esta solicitud), que no se conjuga a una molécula heteróloga, tal como una fracción citotóxica o radiomarca.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables del mismo, que resultan en una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, comparada con un anticuerpo progenitor que no posee esa(s) alteración (alteraciones). Anticuerpos preferidos madurados por afinidad tendrán afinidades nanomolares o, incluso, picomolares para el antígeno diana. Anticuerpos madurados por afinidad se producen por procedimientos conocidos en el arte. Marks *et al.*, *Biotechnology*, 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad por entremezcla de dominio VH y VL.

Mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos de estructura alterna se describen en: Barbas, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Shier *et al.*, *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, *J. Mol Biol* 226:889-896 (1992).

Un "anticuerpo agonista" es un anticuerpo que une y activa un receptor. Generalmente, la capacidad de activación de receptor del anticuerpo agonista será, como mínimo, cualitativamente similar (y puede ser esencialmente cuantitativamente similar) a la de un ligando agonista nativo del receptor. Un ejemplo de un anticuerpo agonista es uno que se une a un receptor en la superfamilia de receptores TNF, tal como DR5, e induce apoptosis de células que expresan el receptor TNF (por ejemplo, DR5). Análisis para determinar la inducción de apoptosis se describen en WO98/51793 y WO99/37684, las cuales se incorporan expresamente en esta solicitud por referencia.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En incorporaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95% en peso del anticuerpo, según se determine por el método de Lowry y, muy preferiblemente más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de vaso giratorio, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras, usando azul Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Un anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes, puesto que no estará presente por lo menos un componente del entorno natural del anticuerpo. De ordinario, sin embargo, el antagonista aislado se preparará en por lo menos un paso de purificación.

Un anticuerpo HER2 que "inhibe la dimerización HER más efectivamente que Trastuzumab" es uno que reduce o elimina los dímeros HER más efectivamente (por ejemplo por lo menos alrededor de 2 veces más efectivamente) que Trastuzumab. Preferiblemente, tal anticuerpo inhibe la dimerización HER2 por lo menos casi tan efectivamente como un anticuerpo seleccionado del grupo conformado por el anticuerpo monoclonal murino 2C4, un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal murino 2C4, Pertuzumab, y un fragmento Fab de

Pertuzumab. Se puede evaluar la inhibición de la dimerización HER estudiando los dímeros HER directamente, o evaluando la activación HER, o la señalización corriente abajo, que resulta de la dimerización HER, y/o evaluando el sitio de unión anticuerpo-HER2, etc. Análisis para cribar los anticuerpos con la capacidad de inhibir la dimerización HER más efectivamente que Trastuzumab se describen en Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) y WO01/00245 (Adams *et al.*). A modo de ejemplo únicamente, se puede analizar con respecto a la inhibición de la dimerización HER evaluando, por ejemplo, la inhibición de la formación de dímero HER (véase, por ejemplo, Fig. 1A-B de Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002); y WO01/00245); la reducción en la activación del ligando HER de células que expresan dímeros HER (WO01/00245 y Fig. 2A-B de Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); bloqueo de unión de ligando HER a células que expresan dímeros HER (WO01/00245, y Fig. 2E de Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición del crecimiento celular de células cancerosas (por ejemplo, células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D), que expresan dímeros HER en la presencia (o ausencia) del ligando HER (WO01/00245 y Figs. 3A-D de Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición de la señalización corriente abajo (por ejemplo, inhibición de la fosforilación de AKT dependiente de HRG, o inhibición de la fosforilación MAPK dependiente de HRG o TGF α) (véase, WO01/00245, y Fig. 2C-D de Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo). Se puede evaluar asimismo si el anticuerpo inhibe la dimerización HER estudiando el sitio de unión anticuerpo-HER2, por ejemplo, evaluando una estructura o modelo, tal como una estructura cristalina, del anticuerpo unido a HER2 (véase, por ejemplo, Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)).

El anticuerpo HER2 puede "inhibir la fosforilación de AKT dependiente de HRG" y/o inhibir "la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α " más efectivamente (por ejemplo por lo menos 2 veces más efectivamente) que Trastuzumab (véase, Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) y WO01/00245, a modo de ejemplo).

El anticuerpo HER2 puede ser uno que "no inhibe el corte proteolítico del ectodominio HER2" (Molina *et al.*, *Cancer Res.* 61:4744-4749(2001)).

Un anticuerpo HER2 que "se une a un sitio heterodimérico de unión" de HER2, se une a residuos en el dominio II (y, de manera opcional, se une asimismo a residuos en otro de los dominios del dominio extracelular HER2, tal como los dominios I y III), y puede impedir estéricamente, por lo menos en alguna medida,

la formación de un heterodímero HER2-EGFR, EGFR2-HER3, o HER2-HER4. Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5:317-328 (2004) caracterizan la estructura cristalina de HER2-Pertuzumab, depositada ante el RCSB Protein Data Bank (ID Code IS78), que ilustra un anticuerpo ejemplar que se une al sitio heterodimérico de unión de HER2.

Un anticuerpo que "se une al dominio II" de HER2 se une a residuos en el dominio II y, opcionalmente, residuos en otro dominio(s) de HER2, tales como los dominios I y III. Preferiblemente el anticuerpo que se une al dominio II se une al empalme entre los dominios I, II y III de HER2.

Un "agente inhibidor de crecimiento", cuando se emplea en esta solicitud, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa HER *in vitro* o *in vivo*. Por consiguiente, el agente inhibidor de crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan HER en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores de crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de fase M. Bloqueadores clásicos de fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 pasan también a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Más información puede encontrarse en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente página 13).

Ejemplos de anticuerpos "inhibidores de crecimiento" son aquellos que se unen a HER2 e inhiben el crecimiento de células cancerosas, que sobreexpresan HER2. Anticuerpos HER2 inhibidores de crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células de tumor de mama SK-BR-3 en un cultivo de células en más de 20% y, preferiblemente, más de 50% (por ejemplo, desde alrededor de 50% a alrededor de 100%) con una concentración de anticuerpo de alrededor de 0.5 a 30 µg/ml, en donde la inhibición del crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase Patente de los Estados Unidos No. 5,677,171 expedida el 14 de octubre de 1997). El análisis de inhibición del crecimiento de las células SK-BR-3 se describe con más detalle

en esa patente y más adelante en esta solicitud. El anticuerpo inhibidor de crecimiento preferido es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal murino 4D5, por ejemplo, Trastuzumab.

Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada, determinada por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular ("**cell shrinkage**"), dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular, y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). Usualmente la célula es una que expresa el antígeno al cual se une el anticuerpo. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral. Por ejemplo, puede medirse la translocación de la fosfatidil serina (PS) por unión de anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse mediante la formación escalonada de ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con la fragmentación de ADN puede evaluarse por cualquier aumento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce apoptosis es uno que resulta en alrededor de 2 a 50 veces, preferiblemente alrededor de 5 a 50 veces y, muy preferiblemente, alrededor de 10 a 50 veces, la inducción de unión de anexina, relativa a una célula no tratada, en un análisis de unión a anexina usando células que expresan un antígeno, al cual se une el anticuerpo. Ejemplos de anticuerpos que inducen apoptosis son los anticuerpos HER2 7C2 y 7F3, y ciertos anticuerpos DR5.

El "epítipo 2C4" es la región en el dominio extracelular de HER2 al cual se une el anticuerpo 2C4. Con el fin de cribar con respecto a anticuerpos que se unen al epítipo 2C4, puede llevarse a cabo un análisis de bloqueo cruzado rutinario, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, puede realizarse mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 2C4 de HER2. El epítipo 2C4 comprende residuos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. 2C4 y Pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en el empalme de los dominios I, II y III. Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

El "epítipo 4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la cual se unen el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y Trastuzumab. Este epítipo es cercano al dominio transmembrana de HER2, y está en el Dominio IV de HER2. Con el fin de cribar con respecto a anticuerpos que se unen al epítipo 4D5, puede llevarse a cabo un análisis de bloqueo cruzado rutinario, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and

David Lane (1988). Alternativamente, puede realizarse mapeo de epítomos para evaluar si el anticuerpo se une al epítomo 4D5 de HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más residuos en la región desde alrededor del residuo 529 a alrededor del residuo 625, inclusive, de HER2).

El "epítomo 7C2/7F3" es la región en el término amino, en el Dominio I, del dominio extracelular de HER2, al cual se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado con la ATCC, véase más adelante). Con el fin de cribar con respecto a anticuerpos que se unen al epítomo 7C2/7F3, puede llevarse a cabo un análisis de bloqueo cruzado rutinario, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, puede realizarse mapeo de epítomos para evaluar si el anticuerpo se une al epítomo 7C2/7F3 en HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más residuos en la región desde alrededor del residuo 22 a alrededor del residuo 53 de HER2).

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Las personas en necesidad de tratamiento incluyen aquellas que ya sufren la enfermedad, así como aquellas en las cuales tiene que prevenirse la enfermedad. Por consiguiente, el paciente a tratar en esta solicitud puede haberse diagnosticado como portador de la enfermedad o puede estar predispuesto o ser susceptible a la enfermedad.

Los términos "cáncer" y "canceroso" o "maligno" se refieren a, o describen, la condición fisiológica en mamíferos, que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular descontrolado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma incluidos adenocarcinoma, linfoma, blastoma (incluidos meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluidos liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluidos tumores carcinoides, gastrinoma, y insulinoma), mesotelioma, schwannoma (incluido neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma, y leucemia o neoplasias malignas linfoides. Ejemplos más particulares de tales neoplasias malignas incluyen carcinoma epidermoide (por ejemplo, carcinoma epitelial), cáncer pulmonar incluidos cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón amicrocítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o del estómago, incluidos cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer del hígado, cáncer de la vejiga, hematoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o

uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de la tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello.

El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un medicamento, efectiva para una enfermedad en el paciente. Donde la enfermedad es cáncer, la cantidad efectiva del medicamento puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, retardar en alguna medida y, preferiblemente, detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, retrasar en alguna medida y, preferiblemente, detener) la metástasis del tumor; inhibir en alguna medida el crecimiento del tumor; y/o aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el medicamento puede prevenir el crecimiento y/o eliminar células cancerosas existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad efectiva puede ampliar la supervivencia libre de progresión, resultar en una respuesta objetiva (incluidas una respuesta parcial, PR, o respuesta completa, CR), incrementar el tiempo total de supervivencia, y/o mejorar uno o más síntomas de cáncer.

Un "cáncer que sobreexpresa HER2" es uno que comprende células que tienen la proteína HER2 presente en su superficie celular.

Un cáncer que "sobreexpresa" un receptor HER es uno que tiene niveles significativamente más altos de un receptor HER, tal como HER2, en su superficie celular, comparado con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Tal sobreexpresión puede ser causada por amplificación génica o por transcripción o traducción incrementada. La sobreexpresión de receptor HER puede determinarse en un análisis diagnóstico o pronóstico evaluando niveles crecientes de la proteína HER presente en la superficie de una célula (*por ejemplo*, mediante un análisis inmunohistoquímico; IHC). Alternativa, o adicionalmente, se pueden medir niveles de ácido nucleico codificante de HER en la célula, *por ejemplo*, mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase WO 98/45479 publicada en octubre de 1998), técnicas **southern blotting**, o reacción en cadena de polimerasa (PCR), tal como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Se puede estudiar también la sobreexpresión del receptor HER midiendo el antígeno circulante (*por ejemplo*, dominio extracelular HER) en un fluido biológico tal como suero (véase, *por ejemplo*, Patente de los Estados Unidos 4,933,294 expedida el 12 de junio de 1990; WO 91/05264 publicada el 18 de abril de 1992;

Patente de los Estados Unidos 5,401,638 expedida el 28 de marzo de 1995; y Sias *et al.*, *J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)). Aparte de los análisis anteriores, se encuentran a disposición del médico profesional varios otros análisis *in vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del organismo del paciente a un anticuerpo, que se marca opcionalmente con un marcador detectable, *por ejemplo*, un isótopo radioactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo a células en el paciente, *por ejemplo*, mediante barrido externo para detectar radioactividad, o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Recíprocamente, un cáncer que "no sobreexpresa el receptor HER2 receptor" es uno que no expresa niveles más altos que los normales de receptor HER, comparados con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido.

Un cáncer que "sobreexpresa" un ligando HER es uno que produce niveles significativamente más altos de ese ligando, comparados con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Tal sobreexpresión puede ser causada por amplificación génica o por transcripción o traducción incrementada. La sobreexpresión del ligando HER puede determinarse diagnósticamente evaluando niveles del ligando (o ácido nucleico que lo codifica) en un paciente, *por ejemplo*, en una biopsia del tumor o mediante varios análisis diagnósticos tales como IHC, FISH, **southern blotting**, PCR o análisis *in vivo* descritos anteriormente.

El término "agente citotóxico", tal como se usa en esta solicitud, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa destrucción de las células. El término tiene como finalidad incluir isótopos radioactivos (*por ejemplo*, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos sus fragmentos y/o variantes.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de enfermedades como cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXANTM); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluidas altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colquicinas; ácido betulínico;

una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichin, phenesterine, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediíno (*por ejemplo*, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina γ_1^1 y caliqueamicina Ω_1^1 (véase, *por ejemplo*, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluida dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos relacionados de enediíno cromoproteína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluidas ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y deoxidoxorrubicina, inyección de liposomas de HCl de clodoxorrubicina (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX®), y deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil;

amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornithine; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; phenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSKL® complejo de polisacáridos (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente T-2 toxina, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, *por ejemplo*, paclitaxel (TAXOL®, formulación de nanopartículas diseñadas con albúmina de paclitaxel (AMBRAXANE™) y doxetaxel (TAXOTERE®); clorambucil; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vincas, que impiden la polimerización de tubulina de formar microtúbulos, incluida vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovovina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluido bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos complementarios, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alpha, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN®, y la vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosomas (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (RI 1577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores EGFR (véase definición más adelante); inhibidores de tirosina cinasa (véase definición más adelante); y sales,

ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

También incluidos en esta definición se encuentran agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas en tumores, tales como anti-estrógenos con perfil mixto agonista/antagonista, incluidos, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVTSTA®), trioxifeno, keoxifeno, y moduladores selectivos de receptor de estrógeno (SERM) tales como SERM3; anti-estrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®), y EM800 (tales agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógeno (ER), inhibir la unión de ADN, aumentar la rotación de ER, y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de aromatasa, incluidos los inhibidores de aromatasa esteroides tales como formestano y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores de aromatasa no esteroides tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluidos vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, imidazol; agonistas de luliberina, incluidas leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina, y tripterelina; esteroides sexuales, incluidas progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilstilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, ácido transretionico y fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores por disminución de receptor de estrógeno (ERD); anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; testolactona; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Tal como se emplea en esta solicitud, el término "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une a EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Ejemplos de tales agentes incluyen anticuerpos y pequeñas moléculas que se unen a EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, Patente de los Estados Unidos No. 4,943, 533, Mendelsohn *et al.*) y sus variantes, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reconfigurado

49 46

(H225) (véase, WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se unen EGFR mutante tipo II (Patente de los Estados Unidos No. 5,212,290); anticuerpos humanizados y quiméricos que unen EGFR, como se describe en Patente de los Estados Unidos No. 5,891,996; y anticuerpos humanos que unen EGFR, tales como ABX-EGF (véase WO98/50433, Abgenix). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando en esa forma un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, EP659,439A2, Merck Patent GmbH). Ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR incluyen ZD 1839 o Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca), CP-358774 o Erlotinib HCL (TARCEVA™; Genentech/OSI) y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

Un "inhibidor de tirosina cinasa" es una molécula que inhibe en cierta medida la actividad de una tirosina cinasa tal como un receptor HER. Ejemplos de tales inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR anotados en el párrafo precedente, así como el inhibidor de tirosina cinasa HER2 de molécula pequeña tal como TAK165 disponible de Takeda, inhibidores dual-HER tales como EKB-569 (disponible de Wyeth), el cual se une preferencialmente a EGFR pero inhibe las células que sobreexpresan a los dos HER2 & EGFR, GW572016 (disponible de Glaxo) un inhibidor de tirosina cinasa HER2 y EGFR oral, y PKI- 166 (disponible de Novartis); inhibidores pan-HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1 tales como el agente complementario ISIS-5132, disponible de ISIS Pharmaceuticals, que inhibe la señalización Raf-1; inhibidores de TK no dirigida a HER tales como mesilato de Imatinib (Gleevac™) disponible de Glaxo; inhibidor de cinasa I regulada por MAPK extracelular CI-1040 (disponible de Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)-quinazolinina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamina)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen fracciones nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Larnber); moléculas complementarias (por ejemplo, aquellas que se unen a ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (Patente de los Estados Unidos No. 5,804,396); trifostinas (Patente de los Estados Unidos No. 5,804,396); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-IC11 (Imclone); o como se describe en

57

50

cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: Patente de los Estados Unidos No. 5,804,396; WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer, Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); y WO96/33980 (Zeneca).

Un "agente anti-angiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento, involucrado en promover angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido en esta solicitud es un anticuerpo que se une al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), tal como Bevacizumab (AVASTIN®).

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citocinas se encuentran somatotropina tal como somatotropina humana, somatotropina humana N-metionilo, y somatotropina bobina; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glucoproteína tales como folitropina (FSH), tirotropina (TSH), y lutropina (LH); somatotropina hepática; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α y β ; sustancia inhibidora de Müller; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento neurales; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento insulinoide tipo I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón α , β , y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófago (M-CSF); CSF de granulocito-macrófago (GM-CSF); y CSF de granulocito (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos incluido LIF y ligando de kit (KL). Tal como se emplea en esta solicitud, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

Preferiblemente, el anticuerpo que se formula es esencialmente puro y, en forma deseable, esencialmente homogéneo (es decir, libre de proteínas

contaminantes, etc). Anticuerpo "esencialmente puro" significa una composición que comprende por lo menos alrededor de 90% en peso del anticuerpo, basándose en el peso total de la composición, preferiblemente por lo menos alrededor de 95% en peso. Anticuerpo "esencialmente homogéneo" significa una composición que comprende por lo menos alrededor de 99% en peso de anticuerpo, basándose en el peso total de la composición.

Un "marcador de superficie de linfocito B" o "antígeno de superficie de linfocito B" en esta solicitud es un antígeno expresado en la superficie de un linfocito B que puede tomar como diana con un anticuerpo que se une a él. Marcadores ejemplares de superficie de linfocito B incluyen los marcadores de superficie de leucocito CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para descripciones, véase *The Leukocyte Antigen Facts Book*, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay *et al.*, Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Otros marcadores de superficie de linfocito B incluyen RP105, FcRH2, CR2 de linfocito B, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, y 239287. El marcador de superficie de linfocito B de interés particular en esta solicitud se expresa preferencialmente en linfocitos B, comparado con otros tejidos distintos de linfocitos B de un mamífero, y pueden expresarse en linfocitos B precursores y linfocitos B maduros. El marcador de superficie de linfocito B preferido en esta solicitud es CD20 ó BR3.

El antígeno "CD20", o "CD20," es una fosfoproteína no glucosilada de alrededor de 35-kDa, hallada en la superficie de más del 90% de los linfocitos B de la sangre periférica u órganos linfoides. El CD20 está presente tanto en los linfocitos B normales como también en los linfocitos B malignos, pero no se expresa en células madre. Otros nombres para CD20 en la literatura incluyen "antígeno restringido por linfocito B" y "Bp35". El antígeno CD20 se describe en Clark *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 82:1766 (1985), por ejemplo.

Puramente para los propósitos de esta solicitud, "2H7 humanizado" se refiere a una variante humanizada del anticuerpo 2H7 cuyas secuencias CDR se divulgan en la Patente de los Estados Unidos No. 5,500,362 (Figs. 5 y 6), expresamente incorporada en esta solicitud por referencia. Ejemplos de anticuerpos 2H7 humanizados en esta solicitud incluyen las variantes descritas en WO2004/056312, también expresamente incorporada en esta solicitud por referencia, así como otras variantes, incluidas, pero no limitadas a: 2H7v16,

2H7v31, 2H7v73, 2H7v75, 2H7v96, 2H7v114, 2H7v115, 2H7v116, 2H7v138, 2H7v477, 2H7v375, etc.

En una incorporación, el anticuerpo 2H7 humanizado comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de las siguientes secuencias CDR:

secuencia CDR L1 RASSSVSYXH en donde X es M o L (SEQ ID No. 67), por ejemplo SEQ ID No. 57 (Fig. 18A),

secuencia CDR L2 de SEQ ID No. 58 (Fig. 18A),

secuencia CDR L3 QQW XFNPPT en donde X es S o A (SEQ ID No. 68), por ejemplo SEQ ID No. 59 (Fig. 18A),

secuencia CDR H1 de SEQ ID No. 60 (Fig. 18B),

secuencia CDR H2 de AIYPGNGXTSYNQKFKG en donde X es D o A (SEQ ID No. 69), por ejemplo SEQ ID No. 61 (Fig. 18B), y

secuencia CDR H3 de VVYYSXXYWYFDV en donde la X en la posición 6 es N, A, Y, W o D, y la X en la posición 7 es S o R (SEQ ID No. 70), por ejemplo SEQ ID No. 62 (Fig. 18B).

Las secuencias CDR anteriores están generalmente presentes en las secuencias de estructura alterna pesadas variables y ligeras variables humanas, tales como sustancialmente los residuos FR de consenso humanos del subgrupo I kappa de cadena ligera humano ($V_{L\kappa I}$), y sustancialmente los residuos FR de consenso humanos del subgrupo III de cadena pesada humano (V_{HIII}). Véase también WO 2004/056312 (Lowman *et al.*).

La región pesada variable puede empalmarse a una región constante de cadena IgG humana, en donde la región puede ser, por ejemplo, IgG1 o IgG3, incluidas regiones constantes de variantes y secuencias naturales.

En una incorporación preferida, tal anticuerpo comprende la secuencia de dominio pesado variable de SEQ ID No. 29 (v16, como se muestra en Fig. 18B), comprendiendo también opcionalmente la secuencia de dominio ligero variable de SEQ ID No. 26 (v16, como se muestra en Fig. 18A), la cual comprende opcionalmente una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 56, 100, y/o 100a, por ejemplo D56A, N100A o N100Y, y/o S100aR en el dominio pesado variable, y una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 32 y/o 92, por ejemplo M32L y/o S92A, en el dominio ligero variable. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo intacto que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID Nos. 63 ó 64, y las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID No. 65, 66, 71 ó 72.

Un anticuerpo 2H7 humanizado preferido es ocrelizumab (Genentech).

El anticuerpo en esta solicitud puede comprender además por lo menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejore la actividad ADCC, tal como una en donde las sustituciones de aminoácido están en las posiciones 298, 333, y 334, preferiblemente S298A, E333A, y K334A, usando la numeración Eu de residuos de cadena pesada. Véase asimismo Patente de los Estados Unidos No. 6,737,056B1, Presta.

Cualquiera de estos anticuerpos puede comprender por lo menos una sustitución en la región Fc, que mejore la unión FcRn o semivida sérica, por ejemplo una sustitución en la posición de cadena pesada 434, tal como N434W. Véase también Patente de los Estados Unidos No. 6,737,056B1, Presta.

Cualquiera de estos anticuerpos puede comprender además por lo menos una sustitución en la región Fc que aumente la actividad CDC, por ejemplo, que comprenda por lo menos una sustitución en la posición 326, preferiblemente K326A o K326W. Véase igualmente Patente de los Estados Unidos No. 6,528,624B 1 (Idusogie *et al.*).

Algunas variantes preferidas de 2H7 humanizado son aquellas que comprenden el dominio ligero variable de SEQ ID No. 26 y el dominio pesado variable de SEQ ID No. 29, incluidas aquellas con o sin sustituciones en una región Fc (si está presente), y aquellas que comprenden un dominio pesado variable con alteración N100A; o D56A y N100A; o D56A, N100Y, y S100aR; en SEQ ID No. 29 y un dominio ligero variable con alteración M32L; o S92A; o M32L y S92A; en SEQ ID No. 26.

M34 en la cadena pesada variable de 2H7v16 se ha identificado como una fuente potencial de estabilidad de anticuerpo y es otro candidato potencial para sustitución.

En un resumen de varias incorporaciones preferidas de la invención, la región variable de variantes basadas en 2H7v16 comprende las secuencias de aminoácidos de v16, excepto en las posiciones de sustituciones de aminoácido que se indican en la siguiente Tabla. A menos que se indique lo contrario, las variantes 2H7 tendrán la misma cadena ligera que la de v16.

Variantes Ejemplares de Anticuerpo 2H7 Humanizado

Versión 2H7	Cambios de Cadena Pesada	Cambios de Cadena Ligera	Cambios Fc
16 para referencia			

61

54

31	-		S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D,
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A,
375	-	-	K334L
588	-	-	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y,	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A

Un 2H7 humanizado preferido comprende la secuencia de dominio ligero variable 2H7v16:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No. 26);

y la secuencia de dominio pesado variable 2H7v16:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWFYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID No. 29).

Donde el anticuerpo 2H7v16 humanizado es un anticuerpo intacto, éste puede comprender la secuencia de aminoácidos de cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID No. 63);

y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID No. 65 o:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWFYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID No. 71).

Otro anticuerpo 2H7 humanizado preferido comprende la secuencia de dominio ligero variable 2H7v511:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No. 73)

y la secuencia de dominio pesado variable 2H7v511:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSYRYWFYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID No. 74).

En donde el anticuerpo 2H7v511 humanizado es un anticuerpo intacto, éste puede comprender la secuencia de aminoácidos de cadena ligera:

68

55

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
 TLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEC (SEQ ID No. 64)

y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID No. 66 o:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGR
 FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLA
 PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLTQDVLNGKEYCKKVSNAALPAPIAA
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID No. 72).

Una "neoplasia maligna de linfocitos B" en esta solicitud comprende linfoma no hodgkiniano (NHL), incluido NHL de bajo grado/folicular, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado elevado, NHL linfoblástico de grado elevado, NHL de microcitos no segmentados de grado elevado, linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA, y macroglobulinemia de Waldenstrom; leucemia, incluida leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), tricoleucemia y leucemia mieloblástica crónica, y otras neoplasias malignas hematológicas. Tales neoplasias malignas pueden tratarse con anticuerpos dirigidos contra marcadores de superficie de linfocitos B, tales como CD20.

El término "linfoma no hodgkiniano" o "NHL", como se usa en esta solicitud, se refiere a un cáncer del sistema linfático, distinto de los linfomas hodgkinianos. Por lo general, los linfomas hodgkinianos pueden distinguirse de los linfomas no hodgkinianos por la presencia de células de Reed-Sternberg en linfomas hodgkinianos y la ausencia de dichas células en linfomas no hodgkinianos. Ejemplos de linfomas no hodgkinianos comprendidos por el término, como se emplea en esta solicitud, incluyen cualquiera que sería identificado como tal por un experto en el arte (por ejemplo, un oncólogo o patólogo), de acuerdo con esquemas de clasificación conocidos en el arte, tal como el esquema Revised European-American Lymphoma (REAL) como se describe en Color Atlas of Clinical Hematology, Third Edition; A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Limited 2000) (véase, en particular Fig. 11.57, 11.58 y/o 11.59). Ejemplos más específicos incluyen, pero no se limitan a, NHL de recaída o resistente a tratamiento, NHL de bajo grado de primera línea, NHL de Fase III/IV, NHL resistente a la quimioterapia, leucemia linfoblástico de precursores B y/o

linfoma, linfomas linfocíticos pequeños, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B y/o leucemia prolinfocítica y/o linfoma linfocítico pequeño, linfoma prolinfocítico de linfocitos B, inmunocitoma y/o linfoma linfoplasmacítico, linfoma de linfocitos B de zona marginal, linfoma de zona marginal esplénica, linfoma MALT – zona marginal extranodal, linfoma de zona marginal nodal, tricoleucemia, plasmacitoma y/o mieloma de células plasmáticas, linfoma de bajo grado/folicular, NHL de grado intermedio/folicular, linfoma de células de manto, linfoma del centro del folículo (folicular), NHL difuso de grado intermedio, linfoma de linfocitos B grandes difusos, NHL crónico activo (incluido NHL de primera línea crónico activo y NHL de recaída crónico activo), NHL recurrente o resistente a trasplante de células madre autólogo, linfoma de linfocitos B grandes mediastinales primarios, linfoma de efusión primario, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL linfoblástico de grado alto, NHL de células no segmentadas de alto grado, NHL de enfermedad de tumor sólido ("**bulky disease NHL**"), linfoma de Burkitt, leucemia linfoblástica de linfocitos T (periféricos) precursores y/o linfoma, linfoma de linfocitos T en adulto y/o leucemia, leucemia linfocítica crónica de linfocitos T y/o leucemia prolinfocítica, leucemia linfocítica granular grande, micosis fungoides y/o síndrome de Sezary, linfoma (tipo nasal) de linfocitos T/citotóxicos naturales extranodales, linfoma de linfocitos T tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T hepatoesplénico, linfoma de linfocitos T tipo paniculitis subcutánea, linfomas de la piel (cutáneos), linfoma de células grandes anaplásicas, linfoma angiocéntrico, linfoma de linfocitos T intestinales, linfoma de linfocitos T (no especificado en otra forma) periféricos y linfoma de linfocitos T angioinmunoblástico.

Una "enfermedad autoinmunitaria" contemplada aquí es una enfermedad o trastorno que se origina y dirige contra los propios tejidos de un individuo, o un co-segregado o manifestación o afección resultante del mismo. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero no se limitan a artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide en jóvenes, osteoartritis, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante), psoriasis, dermatitis, incluida dermatitis atópica; urticaria idiopática crónica, incluida urticaria autoinmunitaria crónica, polimiositis/dermatomiositis, necrólisis epidérmica tóxica, escleroderma (incluido escleroderma sistémico), esclerosis tal como esclerosis sistémica progresiva, síndrome de intestino irritable (IBD) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de intestino irritable autoinmunitario), *pyoderma gangrenosum*, *erythema nodosum*, colangitis esclerosante primaria, episcleritis), síndrome disneico, incluido síndrome disneico en adultos (ARDS), meningitis, enfermedades

mediadas por IgE tales como anafilaxis y rinitis alérgica y atópica, encefalitis tal como encefalitis de Rasmussen, uveítis o uveítis autoinmunitaria, colitis tales como colitis microscópica y colitis colágena, glomerulonefritis (GN) tales como GN membranosa (neuropatía membranosa), GN membranosa idiopática, GN proliferativa membranosa (MPGN), incluidas GN Tipo I y Tipo II, y de rápida evolución, afecciones alérgicas, reacción alérgica, eczema, asma, estados que involucran la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, arterioesclerosis, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (SLE) tal como SLE cutáneo, lupus eritematoso cutáneo sub-agudo, lupus (incluidas nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, discoide, alopecia), diabetes sacarina de aparición en jóvenes (tipo I), incluida diabetes sacarina insulino dependiente pediátrica (IDDM), diabetes sacarina (tipo II) de aparición en adultos, esclerosis múltiple (MS) tal como MS espino-óptica, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y diferida mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluida granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis (incluidas vasculitis de vasos grandes (incluidas *polymyalgia rheumatica* y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos medianos (incluidas la enfermedad de Kawasaki y *polyarteritis nodosa*), Vasculitis SNC, y vasculitis necrosante sistémica, vasculitis asociada con anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos (ANCA), tal como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria incluida anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia perniciosa, aplasia de glóbulos rojos puros (PRCA), deficiencia de factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que involucran diapédesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión de órganos múltiples, enfermedades mediadas por complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal anti-glomerular, síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet o Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide tal como penfigoide vesicular, pénfigo (incluidos *pemphigus vulgaris*, *foliaceus*, y penfigoide *pemphigus mucus-membrane*), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad de Reiter, nefritis de complejo inmunitario, neuropatía crónica tal como polineuropatías IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (desarrollada

por pacientes con infarto del miocardio, por ejemplo), incluidas púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y trombocitopenia autoinmunitaria o mediada inmunitariamente, tal como púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), incluida ITP crónica o aguda, enfermedad autoinmunitaria de los testículos y ovario, incluidas orquitis autoinmunitarias y ooforitis, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluida tiroiditis tal como tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroide autoinmunitaria, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluidos síndromes paraneoplásicos neuronales, tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome de hombre rígido o persona rígida, encefalomiелitis tal como encefalomiелitis alérgica, miastenia grave, degeneración cerebelar, encefalitis límbica o del tronco cerebral, neuromiotonía, síndrome de opsoclonus u opsoclonus mioclonus (OMS), y neuropatía sensorial, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfoide, bronchiolitis obliterans (no trasplante) vs NSDP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (neuropatía IgA), cirrosis biliar primaria, esprúe celíaco (enteropatía del gluten), esprúe resistente a tratamiento, dermatitis herpetiformis, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), arteriopatía coronaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED), o pérdida autoinmunitaria del oído, síndrome opsoclonus mioclonus (OMS), policondritis tal como policondritis resistente a tratamiento, proteinosis alveolar pulmonar, amiloidosis, hepatitis de células gigantes, escleritis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de linfocitos B monoclonales (por ejemplo, gammopatía monoclonal benigna y gammopatía monoclonal de significación indeterminada, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, enfermedades que involucran una disfunción en el canal iónico tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica, y enfermedades que involucran una disfunción en el canal iónico del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomerulosclerosis segmental focal (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveoretinitis, trastorno hematológico autoinmunitario, fibromialgia, falla endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes,

síndrome de Dressler, alopecia areata, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia, y telangiectasia), infertilidad masculina y femenina, espondilitis anquilosante, enfermedad del tejido conectivo mixto, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, neumonitis ("**farmer's lung**"), eritema multiforme, síndrome pos-cardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón de criadores de aves ("**bird-fancier's lung**"), síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrótica, enfermedad pulmonar intersticial, reacción por transfusión, lepra, malaria, leishmaniasis, kpanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocardial, endoftalmitis, erythema elevatum y diutinum, erythroblastosis fetal, faciitis eosinófila, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flariasis, ciclitis tal como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schönlein, infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), infección de echovirus, cardiomiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubéola, síndromes pos-vacunación, infección por rubéola congénita, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, falla gonadal autoinmunitaria, corea de Sydenham, nefritis pos-estreptocócica, *thromboangitis ubiterans*, tirotoxicosis, tabes dorsalis, y polimialgia de células gigantes.

La "superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral" o "superfamilia de receptores TNF" en esta solicitud se refiere a polipéptidos de receptor unidos por citocinas en la familia TNF. Generalmente, estos receptores son receptores transmembrana tipo I con una o más secuencias repetidoras ricas en cisteína en su dominio extracelular. La superfamilia de receptores TNF puede subdividirse aún más en (1) receptores de muerte; (2) receptores señuelo; y (3) receptores de señalización que carecen de dominios de muerte. Los "receptores de muerte" contienen en su región citoplásmica o intracelular un "dominio de muerte", es decir, una región o secuencia que actúa para transducir señales en la célula que pueden resultar en apoptosis o en inducción de ciertos genes. Los "receptores señuelo" carecen de un dominio de muerte funcional y son incapaces de transducir señales que resultan en apoptosis. Ejemplos de citocinas en la familia del gen TNF incluyen el Factor- α de Necrosis Tumoral (TNF- α), el Factor- β de Necrosis Tumoral (TNF- β o linfotoxina), el ligando CD30, el ligando CD27, el ligando CD40, el ligando OX-40, el ligando 4-1BB, el ligando Apo-1 (también mencionado como ligando Fas o ligando CD95), el ligando Apo-2 (también mencionado como TRAIL), el ligando Apo-3 (también mencionado como TWEAK),

osteoprotegerina (OPG), APRIL, el ligando RANK (también mencionado como TRANCE), y TALL-1 (también mencionado como BlyS, BAFF o THANK). Ejemplos de receptores en la superfamilia de receptores TNF incluyen: Receptor de Factor de Necrosis Tumoral tipo 1 (TNFR1), Receptor de Factor de Necrosis Tumoral tipo 2 (TNFR2), Receptor de Factor de Crecimiento Neural p75 (NGFR), el antígeno de superficie de linfocitos B CD40, el antígeno de linfocitos T OX-40, el receptor Apo-1 (también denominado Fas o CD95), el receptor Apo-3 (también denominado DR3, swl-1, TRAMP y LARD), el receptor denominado "Activador de Transmembrana e Interactor-CAML" o "TACI", proteína BCMA, DR4, DR5 (designadas alternativamente como Apo-2; TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER), DR6, DcRI (también mencionado como TRID, LIT o TRAIL-R3), DcR2 (también denominado TRAIL-R4 o TRUNDD), OPG, DcR3 (también denominado TR6 o M68), CARL, HVEM (también denominado ATAR o TR2), GITR, ZTNFR-5, NTR-I, TNFLI, CD30, receptor β de linfoxina (LTBr), receptor 4-IBB y TR9 (EP988, 371A1).

Los términos "ligando Apo-2", "Apo-2L", "Apo2L", "ligando Apo2L/TRAIL", y "TRAIL" se usan indistintamente en esta solicitud para referirse a una secuencia de polipéptidos que incluye residuos de aminoácidos 114-281, inclusive, 95-281, inclusive, residuos 92-281, inclusive, residuos 91-281, inclusive, residuos 41-281, inclusive, residuos 39-281, inclusive, residuos 15-281, inclusive, o residuos 1-281, inclusive, de la secuencia de aminoácidos mostrada en Figura 24 (SEQ ID No. 46), así como fragmentos biológicamente activos, variantes de delección, inserción, o sustitución de las secuencias anteriores. En una incorporación, la secuencia polipeptídica comprende residuos 114-281 de Fig. 24 (SEQ ID No. 46). Opcionalmente, la secuencia polipeptídica comprende residuos 92-281 o residuos 91-281 de Figura 24 (SEQ ID No. 46). Los polipéptidos Apo-2L pueden codificarse por la secuencia nucleotídica natural mostrada en Figura 24 (SEQ ID No. 45). Opcionalmente, el codón que codifica el residuo Pro119 (Figura 24; (SEQ ID No. 45) puede ser "CCT" o "CCG". Opcionalmente, los fragmentos o variantes son biológicamente activos y tienen por lo menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente por lo menos alrededor de 90% de identidad de secuencia, o por lo menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias anteriores. La definición abarca variantes de sustitución del ligando Apo-2 en las cuales por lo menos uno de sus aminoácidos naturales se sustituyen por otro aminoácido tal como un residuo de alanina. La definición comprende asimismo un ligando Apo-2

de secuencia natural, aislado de una fuente de ligando Apo-2, o preparado por métodos recombinantes o sintéticos. El ligando Apo-2 de la invención incluye los polipéptidos designados como ligando Apo-2 o TRAIL divulgados en WO97/01633 publicada el 16 de enero de 1997, WO97/25428 publicada el 17 de julio de 1997, WO99/36535 publicada el 22 de julio de 1999, WO 01/00832 publicada el 4 de enero de 2001, WO02/09755 publicada el 7 de febrero de 2002, y WO 00/75191 publicada el 14 de diciembre de 2000 y Patente de los Estados Unidos No. 6,030,945 expedida el 29 de febrero de 2000. Los términos se utilizan para referirse generalmente a formas del ligando Apo-2, que incluyen formas monoméricas, diméricas, triméricas, hexaméricas o formas oligoméricas altas del polipéptido. Toda la numeración de residuos de aminoácidos mencionados en la secuencia Apo-2L usa la numeración de acuerdo con la Figura 24 (SEQ ID No. 46), a menos que se indique específicamente lo contrario.

"Receptor de ligando Apo-2" incluye los receptores mencionados en el arte como "DR4" y "DR5". Pan *et al.* han descrito el miembro de la familia de receptor TNF designado como "DR4" (Pan *et al.*, *Science*, 276:111- 113 (1997); véase también WO98/32856 publicada el 30 de julio de 1998; WO 99/37684 publicada el 29 de julio de 1999; WO 00/73349 publicada el 7 de diciembre de 2000; US 6,433,147 expedida el 13 de agosto de 2002; US 6,461,823 expedida el 8 de octubre de 2002, y US 6,342,383 expedida el 29 de enero de 2002). Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818- 821 (1997) y Pan *et al.*, *Science*, 277:815-818 (1997) describieron otro receptor para Apo2L/TRAIL (véase asimismo, WO98/51793 publicada el 19 de noviembre de 1998; WO98/41629 publicada el 24 de septiembre de 1998). Este receptor se designa como DR5 (el receptor se ha designado alternativamente como Apo-2; TRAIL-R, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 o KILLER; Screaton *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); WO98/35986 publicada el 20 de agosto de 1998; EP870,827 publicada el 14 de octubre de 1998; WO98/46643 publicada el 22 de octubre de 1998; WO99/02653 publicada el 21 de enero de 1999; WO99/09165 publicada el 25 de febrero de 1999; WO99/11791 publicada el 11 de marzo de 1999; US 2002/0072091 publicada el 13 de agosto de 2002; US 2002/0098550 publicada el 7 2001; US 6,313,269 expedida el 6 de diciembre de 2001; US 2001/0010924 publicada el 2 de agosto de 2001; US 2003/01255540 publicada el 3 de julio de 2003; US 2002/0160446 publicada el 31 de octubre de 2002, US 2002/0048785 publicada el 25 de abril de 2002; US 6,569,642 expedida el 27 de mayo de 2003, US 6,072,047

expedida el 6 de junio de 2000, US 6,642,358 expedida el 4 de noviembre de 2003). Como se describe anteriormente, otros receptores para Apo-2L incluyen DcR1, DcR2, y OPG. El término "receptor Apo-2L", cuando se utiliza en esta solicitud, abarca un receptor de secuencia natural y variantes de receptor. Estos términos comprenden el receptor Apo-2L expresado en una variedad de mamíferos, incluidos humanos. El receptor Apo-2L puede expresarse endógenamente, ya que ocurre naturalmente en una variedad de linajes de tejido humano, o puede expresarse por métodos recombinantes o sintéticos. Un "receptor Apo-2L de secuencia natural" comprende un polipéptido que posee la misma secuencia de aminoácidos que un receptor Apo-2L, derivado de la naturaleza. Por consiguiente, un receptor Apo-2L de secuencia natural puede tener la secuencia de aminoácidos del receptor Apo-2L de ocurrencia natural de cualquier mamífero, incluidos humanos. Tal receptor Apo-2L de secuencia natural puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término "receptor Apo-2L de secuencia natural" abarca específicamente formas truncadas o secretadas, de ocurrencia natural, del receptor (*por ejemplo*, una forma soluble que contiene, *por ejemplo*, una secuencia de dominio extracelular), formas de variantes de ocurrencia natural (*por ejemplo*, formas alternativamente empalmadas) y variantes alélicas de ocurrencia natural. Variantes de receptor pueden incluir fragmentos o mutantes de delección del receptor Apo-2L de secuencia natural. Figs. 25A-C muestran la secuencia de 411 aminoácidos de DR5 humano, junto con su secuencia nucleotídica (SEQ. ID. Nos. 47 y 48), como se publica en WO 98/51793 el 19 de noviembre de 1998. Una variante de empalme de transcripción de DR5 humano es conocida en el arte. Esta variante de empalme DR5 codifica la secuencia de 440 aminoácidos de DR5 humano, mostrada en Figs. 26A-C, junto con su secuencia nucleotídica (SEQ. ID. Nos. 49 y 50), y como se publica en WO 98/35986 el 20 de agosto de 1998.

"Anticuerpo de receptor de muerte" se usa en esta solicitud para referirse generalmente a un anticuerpo o anticuerpos dirigidos a un receptor en la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral y que contienen un dominio de muerte capaz de señalar apoptosis, y tales anticuerpos incluyen el anticuerpo DR5 y el anticuerpo DR4.

"Anticuerpo de receptor DR5", "anticuerpo DR5", o "anticuerpo anti-DR5" se usan en un sentido amplio para referirse a anticuerpos que unen por lo menos una forma de un receptor DR5 o su dominio extracelular. Opcionalmente el anticuerpo DR5 se fusiona o enlaza a una secuencia heteróloga o molécula. Preferiblemente

la secuencia heteróloga permite o ayuda al anticuerpo a formar complejos oligoméricos, o de orden más elevado. Opcionalmente, el anticuerpo DR5 se une al receptor DR5 pero no se une o reacciona cruzadamente con cualquier receptor Apo-2L adicional (por ejemplo, DR4, DcR1, o DcR2). Opcionalmente, el anticuerpo es un agonista de actividad de señalización de DR5.

Opcionalmente, el anticuerpo DR5 de la invención se une a un receptor DR5 en un rango de concentración de alrededor de 0.1 nM a alrededor de 20 mM, medido en un análisis de unión BIAcore. Opcionalmente, los anticuerpos DR5 de la invención exhiben un valor IC_{50} de alrededor de 0.6 nM a alrededor de 18 mM, medido en un análisis de unión BIAcore.

Puramente para los propósitos de esta solicitud, el término "Apomab" se refiere a un anticuerpo agonista que se une a DR5 y comprende las secuencias de aminoácidos ligeras variables y pesadas variables de SEQ ID Nos. 55 y 56. Preferiblemente Apomab comprende las cadenas ligeras y pesadas de SEQ ID Nos. 51 y 52, respectivamente.

II. Producción de Anticuerpos

Siguen a continuación técnicas para producir anticuerpos que pueden formularse de acuerdo con la presente invención.

(i) Selección y preparación de antígeno

Preferiblemente, el antígeno al cual se une el anticuerpo es una glucoproteína biológicamente importante, y la administración del anticuerpo a un mamífero que sufre de una enfermedad o trastorno puede resultar en un beneficio terapéutico en ese mamífero. No obstante, se contemplan asimismo anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolipídicos asociados con tumores; véase La Patente de los Estados Unidos 5,091,178).

Donde el antígeno es un polipéptido, éste puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, receptor) o ligando tal como un factor de crecimiento. Antígenos ejemplares incluyen moléculas tales como renina; una somatotropina, incluidas la somatotropina humana y la somatotropina bovina; somatoliberina; 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 (TF) y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético atrial; surfactante del pulmón; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa o activador de plasminógeno tipo tisular (t-PA); bombesina;

trombina; factor de crecimiento hematopoyético; 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; una proteína microbiana, tal como betalactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado con linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o factores de crecimiento; 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 de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (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; un factor de necrosis tumoral (TNF) tal como TGF- α y TGF- β 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, CD22 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética de hueso (BMP); un interferón tal como interferón- α , - β , y - γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), *por ejemplo*, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (IL), *por ejemplo*, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 e IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de la membrana de superficie; 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; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos ya enumerados.

Dianas moleculares ejemplares para anticuerpos comprendidos por la presente invención incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34 y CD40; miembros de la familia de receptor ErbB tal como receptor EGF, receptor HER2, HER3 ó HER4; antígenos de superficie de linfocitos B, tales como CD20 o BR3, un miembro de la superfamilia de receptores de necrosis tumoral, incluidos DR5; antígeno de célula madre de próstata (PSCA); moléculas de adhesión celular tales como LFA-I, MacI, p150.95, VLA-4, ICAM-I,

VCAM, integrina $\alpha 4 / \beta 7$, e integrina $\alpha v / \beta 3$, incluidas sus subunidades α o β (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF, así como receptores para ellos; factor tisular (TF); un factor de necrosis tumoral (TNF) tal como TNF- α o TNF- β , interferón α (α -IFN); una interleucina, tal como IL-8; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C, etc.

Antígenos solubles o sus fragmentos, conjugados opcionalmente con otras moléculas, pueden utilizarse como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranales, tales como receptores, pueden usarse fragmentos de éstos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como el inmunógeno. Alternativamente, células que expresan la molécula transmembranal pueden utilizarse como el inmunógeno. Tales células pueden derivarse de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células cancerosas) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranal. Otros antígenos y sus formas útiles para preparar anticuerpos serán evidentes a los expertos en el arte.

Para la producción de anticuerpos HER2, el antígeno HER2 a usarse para su producción puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de HER2 o su porción, que contenga el epítipo deseado. Alternativamente, células que expresan HER2 en su superficie celular (por ejemplo, células NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar HER2; o una línea de células de carcinoma tal como células SK-BR-3, véase Stancovski *et al.*, *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)) pueden usarse para generar anticuerpos.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

Anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles mutaciones que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal. Por consiguiente, el calificativo "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 *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o pueden elaborarse por métodos de ADN recombinante (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567).

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedero apropiado, como un hámster, en la forma descrita 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, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. En seguida, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente fusionante apropiado, tal como polietilén glicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

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 son aquellas que se fusionan eficientemente, favorecen una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de anticuerpo, 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 ejemplo, X63-Ag8-653) disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, 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 *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual crecen 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 enzimoimmunoanálisis absorbente (ELISA).

Por ejemplo, la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

74
67

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, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986). 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 animal.

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, proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (*por ejemplo*, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras 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 hospederas 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 anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospederas recombinantes. Artículos de reseña sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188(1992).

En una incorporación adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de bibliotecas de bacteriófagos de anticuerpos, generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos humanos y murinos, respectivamente, usando bibliotecas de bacteriófagos. Publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (margen nM) mediante entremezcla de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas muy grandes de bacteriófagos (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por consiguiente,

estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN puede modificarse además, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadenas ligeras y pesadas humanas en vez de las secuencias murinas homólogas (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o empalmando covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda, o parte, de la secuencia codificante para un polipéptido distinto de inmunoglobulina.

Típicamente tales polipéptidos distintos de inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio combinante de antígeno de un anticuerpo, para crear un anticuerpo bivalente, quimérico, que comprende un sitio combinante de antígeno, con especificidad para un antígeno, y otro sitio combinante de antígeno con especificidad para un antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos humanizados

Métodos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en el arte. Preferiblemente, 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 *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988), o sustituyendo secuencias de región hipervariable por 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 de región hipervariable y, posiblemente, algunos residuos FR se sustituyen con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, ligeros 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 humanas de dominio variable conocidas. La secuencia humana más próxima a la del roedor se acepta entonces como la región de estructura alterna (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987). Otro método usa una región de estructura alterna particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras y pesadas. La misma estructura alterna puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *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 lograr 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 cuenta con 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 la 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 inmunoglobulina candidata de unir su antígeno. De esta forma, pueden seleccionarse residuos FR y combinarse de las secuencias del recipiendario y de importación, de modo que se obtenga la característica del anticuerpo deseada, tal como una creciente afinidad para el antígeno(s) diana. En general, los residuos de región hipervariable se hallan directa y, la mayoría de las veces, sustancialmente implicados en influir en la unión del antígeno.

WO01/00245 describe la producción de anticuerpos HER2 humanizados ejemplares, que unen HER2 y bloquean la activación de ligando de un receptor HER. El anticuerpo humanizado de interés particular en esta solicitud bloquea la activación de MAPK mediada por EGF, TGF- α y/o HRG, esencialmente en forma tan efectiva como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o su fragmento Fab) y/o une HER2 esencialmente en forma tan efectiva como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o su fragmento Fab). El anticuerpo humanizado en esta solicitud

puede, por ejemplo, comprender residuos no humanos de región hipervariable, incorporados en un dominio pesado variable humano, y puede comprender además una sustitución de región de estructura alterna (FR) en una posición seleccionada del grupo conformado por 69H, 71H y 73H, utilizando el sistema de numeración de dominio variable expuesto en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una incorporación, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H.

Un anticuerpo humanizado ejemplar de interés en esta solicitud comprende residuos determinantes de complementariedad de dominio pesado variable GFTFTDYTMX, donde X es preferiblemente D o S (SEQ ID No. 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO. 8); y/o NLGPSFYFDY (SEQ ID No. 9), comprendiendo opcionalmente modificaciones de aminoácidos de aquellos residuos CDR, por ejemplo, donde las modificaciones esencialmente mantienen o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo de interés puede tener desde alrededor de uno a alrededor de siete o alrededor de cinco sustituciones de aminoácido en las anteriores secuencias CDR pesadas variables. Tales variantes de anticuerpo pueden prepararse mediante maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos de dominio pesado variable en SEQ ID No. 4.

El anticuerpo humanizado puede comprender residuos determinantes de complementariedad de dominio ligero variable KASQDV SIGVA (SEQ ID NO. 10); SASYXXX, donde la X como posición 5 es preferiblemente R o L, en donde la X en la posición 6 es preferiblemente Y o E, y la X como posición 7 es preferiblemente T o S (SEQ ID No. 11); y/o QQYYIYPYT (SEQ ID No. 12), por ejemplo, además de aquellos residuos CDR de dominio pesado variable en el párrafo precedente. Tales anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los residuos CDR anteriores, por ejemplo donde las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo de interés puede tener desde alrededor de una a alrededor de siete, o alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias CDR ligeras variables ya mencionadas. Tales variantes de anticuerpo pueden prepararse mediante afinidad por maduración, por ejemplo, como se describe a continuación. El anticuerpo humanizado más

77 78

preferido comprende la secuencia de aminoácidos de dominio ligero variable en SEQ ID No. 3.

La presente solicitud contempla igualmente anticuerpos madurados por afinidad, los cuales unen HER2 y bloquean la activación de ligando de un receptor HER. El anticuerpo progenitor puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprenda las secuencias pesadas y/o ligeras variables de SEQ ID Nos. 3 y 4, respectivamente (es decir, variante 574). El anticuerpo madurado por afinidad preferiblemente se une al receptor HER2 con una afinidad superior a la del 2C4 murino o variante 574 (por ejemplo, desde alrededor de dos o alrededor de cuatro veces, a alrededor de 100 veces o alrededor de 1.000 veces la afinidad mejorada, por ejemplo, como se evalúa usando un dominio extracelular (ECD) HER2 (ELISA). Residuos CDR pesados variables ejemplares para sustitución incluyen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete de estos residuos). Ejemplos de residuos CDR ligeros variables para alteración incluyen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos a tres, cuatro, cinco o hasta a alrededor de diez de estos residuos). Se contemplan varias formas del anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos, con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo de longitud total, tal como un anticuerpo IgG1 de longitud total.

(iv) *Anticuerpos humanos*

Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (*verbigracia*, ratones) que, luego de la inmunización, son capaces de producir un completo repertorio de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección 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 la completa inhibición de la producción endógena de anticuerpos. 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 ejemplo*, 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); Patentes de los Estados Unidos No. 5,591,669, 5,589,369 y 5,545,807.

Alternativamente, puede usarse tecnología exposición en bacteriófagos 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. 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 cápside mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 ó fd, y se despliegan como fragmentos funcionales de anticuerpo en la superficie de la partícula del bacteriófago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del bacteriófago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo resultan igualmente en la selección del gen codificante del anticuerpo que exhibe estas propiedades. Por consiguiente, el bacteriófago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La exposición en bacteriófagos puede realizarse en una variedad de formatos; para su reseña véase, *por ejemplo*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Para la exposición en bacteriófagos pueden emplearse varias fuentes de segmentos de gen V. Clackson *et al.*, *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 *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véase también las Patentes de los Estados Unidos No. 5,565,332 y 5,573,905.

Como ya se discutió, pueden generarse asimismo anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados *in vitro* (véase las Patentes de los Estados Unidos 5,567,610 y 5,229,275).

Anticuerpos HER2 humanos se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,772,997 expedida el 30 de junio de 1998 y WO 97/00271 publicada el 3 de enero de 1997.

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 ejemplo*, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospederas recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de bacteriófagos de anticuerpos, discutidas anteriormente. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otra metodología, fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células hospederas recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes al profesional experto. 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 ejemplo*, como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5,641,870. Tales fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o bi-específicos.

(vi) *Anticuerpos biespecíficos*

Anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para por lo menos dos epítomos diferentes. Anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos diferentes de la proteína HER2. Otros anticuerpos semejantes pueden combinar un sitio de unión HER2 con sitio(s) de unión para EGFR, HER3 y/o HER4. Alternativamente, un brazo HER2 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 ejemplo*, CD2 ó CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD 16), de modo que se enfoquen mecanismos de defensa celular a la célula que expresa HER2. Anticuerpos biespecíficos pueden usarse asimismo para localizar agentes citotóxicos contra células que expresan HER2. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión HER2 y un brazo que une el agente citotóxico (*por ejemplo*, saporina, anti-interferón-α, vinca alcaloide, cadena de ricina A, metotrexato o el isótopo radioactivo hapteno). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud total o fragmentos de anticuerpo (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

WO 96/16673 describe un anticuerpo HER2/Fc γ RIH biespecífico, y la Patente de los Estados Unidos No. 5,837,234 divulga un anticuerpo HER2/Fc γ RI biespecífico IDM1 (Osidem). Un anticuerpo HER2/Fc α biespecífico se muestra en WO98/02463. La Patente de los Estados Unidos No. 5,821,337 enseña un anticuerpo HER2/CD3 biespecífico. MDX-210 es un HER2-Fc γ RIII Ab biespecífico.

Métodos para elaborar anticuerpos biespecíficos son conocidos en el arte. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud total se basa en la co-expresión de dos parejas de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *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 *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios combinadores 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 que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para unión de la cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los 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 hospedero 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 polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. No obstante, es posible insertar las secuencias codificantes para las dos o todas las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión, cuando la expresión de por lo menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales

resulta en altos rendimientos, o cuando las proporciones no son de significación 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 *et al.*, *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de los Estados Unidos 5,731,168, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpo puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio C_H3 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 ejemplo*, tirosina o triptófano). "Cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena(s) lateral(es) grande(s) se crea(n) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo, reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeñas (*por ejemplo*, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tales como homodímeros.

Anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos enlazados cruzadamente o de "heteroconjugado". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para tomar como diana células del sistema inmunitario contra células no deseadas (Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980), y para tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos de heteroconjugado pueden elaborarse usando cualesquiera métodos convenientes de enlazamiento cruzado. Agentes apropiados de enlazamiento

cruzado 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 enlazamiento cruzado.

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 *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en donde anticuerpos de longitud total se segmentan proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en la presencia del agente acomplejante ditiol arsenita de sodio 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' -tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar el otro derivado Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El avance reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, los cuales pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado $F(ab')_2$. 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 unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 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 biespecífico, directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *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. Este método puede utilizarse asimismo para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos

88

comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H), conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un conector 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 del otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. En la misma forma se ha informado de otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se ha divulgado igualmente otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber *et al.*, *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).

(vii) *Otras modificaciones de secuencias de aminoácidos*

Se contemplan modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en esta solicitud. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis peptídica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de delección, inserción, y sustitución se realiza para arribar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos pueden alterar igualmente el proceso pos-translacional del anticuerpo, tal como modificando el número o posición de los sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis por rastreo de alanina" como se describe por Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Aquí, se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (muy preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces

introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. En consecuencia, aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el desempeño de una mutación en un sitio dado, se conduce mutagénesis aleatoria o por rastreo de alanina en el codón o región diana, y se criban las variantes del anticuerpo expresadas con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que van en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos simples o múltiples de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N- o C-término del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida sérica del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácidos en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de máximo interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero pueden contemplarse asimismo alteraciones de la región FR o Fc. Sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones resultan en un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe con más detalle a continuación con referencia a clases de aminoácidos, y cribarse los productos.

Tabla 1

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln

Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu(L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys(K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se realizan seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre mantener (a) la estructura polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o conformación helicoidal, (b) la carga de hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternativamente, residuos de ocurrencia natural pueden dividirse en grupos, basados en propiedades comunes de cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Sustituciones no conservadoras incluirán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Puede sustituirse además cualquier residuo de cisteína no involucrado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir entrelazamiento cruzado aberrante. Inversamente, enlace(s) de cisteína puede(n) agregarse al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución involucra sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo progenitor (*por ejemplo*, un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, la variante(s) resultante para el desarrollo posterior tendrá propiedades biológicas mejoradas relativas al anticuerpo progenitor, del cual se generan. Un modo conveniente para generar tales variantes de sustitución es maduración por afinidad usando la técnica de exposición en bacteriófagos. En síntesis, varios sitios de región hipervariable (*por ejemplo*, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se exponen en una manera monovalente de partículas de bacteriófago filamentoso como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado con cada partícula. Las variantes expuestas en bacteriófago se criban entonces con respecto a su actividad biológica (*por ejemplo*, afinidad de unión), tal como se divulga en esta solicitud. Con el fin de identificar sitios candidatos de región hipervariable para modificación, puede realizarse mutagénesis dirigida de rastreo de alanina, para identificar residuos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativa, o adicionalmente, puede ser benéfico analizar una estructura cristalina del

44

81

complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos contiguos son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en esta solicitud. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado, como se describe en esta solicitud, y pueden seleccionarse para desarrollo posterior anticuerpos con propiedades superiores en uno o más análisis relevantes.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se da a entender eliminar una o más fracciones carbohidrato halladas en el anticuerpo, y/o agregar uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de polipéptidos es típicamente N- u O-enlazada. N-enlazada se refiere a la unión de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X- serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por consiguiente, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. Glucosilación O- enlazada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, muy comúnmente serina o treonina, si bien pueden usarse igualmente 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se lleva convenientemente a cabo alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas ya descritas (para sitios de glucosilación N-enlazados). La alteración puede hacerse además por la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación O- enlazados).

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a ella puede alterarse. Por ejemplo, anticuerpos con una estructura carbohidrato madura, que carece de la fucosa unida a una región Fc del anticuerpo, se describen en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2003/0157108 AI, Presta, L. Véase también US 2004/0093621 AI (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Anticuerpos con N-acetilglucosamina bisectante (GlcNAc) en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se referencian en WO03/011878, Jean-Mairet *et al.*, y la Patente de los Estados Unidos No. 6,602,684, Umana *et al.* Anticuerpos con

por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se divulgan en WO97/30087, Patel *et al.* Véase, además, WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) en lo concerniente a anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc de los mismos. Composiciones de anticuerpo, que comprenden especies principales del anticuerpo con tales estructuras carbohidrato unidas a la región Fc, se contemplan en esta solicitud.

Moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan por una variedad de métodos conocidos en el arte. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de ocurrencia natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de casete, de una variante previamente preparada o una versión no-variante del anticuerpo.

(viii) *Cribado para detectar anticuerpo con las propiedades deseadas*

Ya se describieron técnicas para generar anticuerpos. Se pueden además seleccionar anticuerpos con ciertas características biológicas, según se desee.

Para identificar un anticuerpo que bloquea la activación de ligando de un HER, puede determinarse la capacidad del anticuerpo de bloquear la unión de ligando HER a células que expresan el receptor HER (*por ejemplo*, en conjugación con otro receptor HER, con el cual el receptor HER de interés forma un hetero-oligómero HER). Por ejemplo, células, que sobreexpresan naturalmente, o transfectadas para expresar, receptores HER del hetero-oligómero HER pueden incubarse con el anticuerpo y luego exponerse al ligando HER marcado. Entonces puede evaluarse la capacidad del anticuerpo HER de bloquear la unión de ligando al receptor HER en el hetero-oligómero HER.

Por ejemplo, la inhibición de la unión de HRG a líneas de células de tumor de mama MCF7 por anticuerpos HER2 puede realizarse usando cultivos monocapa MCF7 sobre hielo en un formato de placa de 24 pocillos, esencialmente como se describe en WO01/00245. Anticuerpos monoclonales HER2 pueden agregarse a cada pocillo e incubarse por 30 minutos. A continuación puede agregarse rHRG β ₁₇₇₋₂₂₄ marcado con ¹²⁵I (25 pm), y la incubación puede continuarse por 4 a 16 horas. Pueden prepararse curvas de respuesta a la dosis y calcularse un valor IC₅₀ para el compuesto de interés. En una incorporación, el anticuerpo que bloquea la activación de ligando de un receptor HER tendrá un IC₅₀ para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este análisis de alrededor de

50nM o menos, más preferiblemente 10nM o menos. Donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, el IC_{50} para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este análisis puede ser, por ejemplo, de alrededor de 100nM o menos, más preferiblemente 50nM o menos.

Alternativa, o adicionalmente, puede evaluarse la capacidad del anticuerpo HER de bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por ligando HER de un receptor HER presente en un hetero-oligómero HER. Por ejemplo, células que expresan endógenamente los receptores HER o transfectadas para expresarlos, pueden incubarse con el anticuerpo y luego analizarse con respecto a la actividad de fosforilación de tirosina dependiente de ligando HER, usando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (que se conjuga opcionalmente con un marcador detectable). El análisis de activación de receptor de cinasa descrito en la Patente de los Estados Unidos 5,766,863 es también utilizable para determinar la activación del receptor HER y el bloqueo de esa actividad por el anticuerpo.

En una incorporación, se puede cribar un anticuerpo que inhiba la estimulación HRG de fosforilación de tirosina p180 en células MCF7, esencialmente como se describe en WO01/00245. Las células MCF7 pueden esparcirse en placas de 24 pocillos, y pueden agregarse anticuerpos monoclonales contra HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura de la sala; luego puede agregarse rHRG $\beta_{1177-244}$ a cada pocillo a una concentración final de 0.2 nM, y la incubación puede continuarse durante 8 minutos. Puede aspirarse el medio de cada pocillo, y las reacciones pueden detenerse por la adición de 100 μ l de amortiguador de muestra SDS (5% SDS, 25 mM DTT, y 25 mM Tris-HCl, pH 6.8). Cada muestra (25 μ l) puede someterse a electroforesis en un gel de gradiente 4-12% (Novex) y luego transferirse electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Pueden desarrollarse inmunoblots de antifosfotirosina (a 1 μ g/ml), y puede cuantificarse la intensidad de la banda reactiva predominante a $M_r \sim 180.000$ mediante densitometría de reflexión. El anticuerpo seleccionado inhibirá de forma preferiblemente significativa la estimulación HRG de la fosforilación de tirosina p180 a alrededor de 0-35% del control en este análisis. Puede prepararse una curva de respuesta a la dosis para la estimulación HRG de la fosforilación de la tirosina p180, determinada por densitometría de reflexión, y calcularse un IC_{50} para el anticuerpo de interés. En una incorporación, el anticuerpo que bloquea la activación de ligando de un receptor HER tendrá un IC_{50} para inhibir la estimulación HRG de la fosforilación de la tirosina p180 en este análisis de

alrededor de 50nM o menos, más preferiblemente 10nM o menos. Donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, el IC₅₀ para inhibir la estimulación HRG de la fosforilación de la tirosina p180 en este análisis puede ser, por ejemplo, de alrededor de 100nM o menos, más preferiblemente 50nM o menos.

Se pueden evaluar también los efectos inhibidores de crecimiento de un anticuerpo en células MDA-MB-175, por ejemplo, esencialmente como se describe en Schaefer *et al.*, *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)). De acuerdo con este análisis, células MDA-MB-175 pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal HER2 (10 µg/mL) durante 4 días y teñirse con cristal violeta. La incubación con un anticuerpo HER2 puede mostrar un efecto inhibidor de crecimiento, en esta línea celular, similar al desplegado por el anticuerpo monoclonal 2C4. En una incorporación adicional, HRG exógena no revertirá significativamente esta inhibición. Preferiblemente, el anticuerpo será capaz de inhibir la proliferación celular de las células MDA-MB-175 en una medida mayor que el anticuerpo monoclonal 4D5 (y, opcionalmente, en una medida mayor que el anticuerpo monoclonal 7F3), ambos en la presencia y ausencia de una HRG exógena.

En una incorporación, el anticuerpo HER2 de interés puede bloquear la asociación, dependiente de herregulina, de HER2 con HER3 en ambas células MCF7 y SK-BR-3, como se determina en un experimento de co-inmunoprecipitación tal como el descrito en WO01/00245, sustancialmente en forma más efectiva que el anticuerpo monoclonal 4D5 y, preferiblemente sustancialmente en forma más efectiva que el anticuerpo monoclonal 7F3.

Para identificar anticuerpos HER2 inhibidores de crecimiento se puede cribar para detectar anticuerpos que inhiban el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan HER2. En una incorporación, el anticuerpo inhibidor de crecimiento de elección es capaz de inhibir el crecimiento de células SK-BR-3 en un cultivo celular en alrededor de 20-100% y, preferiblemente, en alrededor de 50-100% con una concentración de anticuerpo de alrededor de 0.5 a 30 µg/ml. Para identificar tales anticuerpos, puede llevarse a cabo el análisis SK-BR-3 descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,677,171. De acuerdo con este análisis, células SK-BR-3 se cultivan en una mezcla 1:1 de medio F12 y DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, glutamina y penicilina en estreptomycin. Las células se esparcen a 20.000 células en una placa de cultivo de células de 35 mm (2 mls/35mm por placa). Por placa se agregan 0.5 a 30 µg/ml del anticuerpo HER2. Después de seis días, se cuenta el número de

células, comparado con células no tratadas usando un contador electrónico de células COULTER™. Aquellos anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 en alrededor de 20-100% o alrededor de 50-100% pueden seleccionarse como compuestos inhibidores de crecimiento. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 5,677,171 con respecto a análisis para cribar anticuerpos inhibidores de crecimiento, tales como 4D5 y 3E8.

Con el fin de seleccionar anticuerpos HER2 que inducen apoptosis, se dispone de análisis de unión de anexina usando células BT474. Las células BT474 se cultivan y siembran en placas, como se discute en el párrafo precedente. El medio se retira entonces y se reemplaza con medio fresco solo, o medio que contiene 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal. Luego de un período de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan por tripsinización. Entonces se centrifugan las células, se resuspenden en amortiguador de unión Ca^{2+} y se reparten en alícuotas en tubos, como se discute anteriormente, para el análisis de muerte celular. Seguidamente los tubos reciben annexina marcada (*por ejemplo*, annexina V-FITC) (1 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos, que inducen niveles estadísticamente significativos de unión de anexina, en relación con el control, se seleccionan como anticuerpos que inducen apoptosis. Aparte del análisis de unión de anexina, se dispone de un análisis de tinción de ADN usando células BT474. Con el fin de realizar esta análisis, células BT474 que se han tratado con el anticuerpo de interés, como se describe en los dos párrafos precedentes, se incuban con 9µg/ml HOECHST 33342™ durante 2 horas a 37°C, luego se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) usando software MODFIT LT™ (Verity Software House). Los anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas, que es 2 veces o más (y, preferiblemente, 3 veces o más) que las células no tratadas (células apoptóticas hasya el 100%), pueden seleccionarse como anticuerpos pro-apoptóticos usando este análisis. Véase WO98/17797 con respecto a análisis para detectar anticuerpos HER2, que inducen apoptosis, tales como 7C2 y 7F3.

Para cribar anticuerpos, que se unen a un epítipo en HER2 ligado por el anticuerpo de interés, puede realizarse un análisis rutinario de enlazamiento cruzado, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), con el fin de evaluar si el anticuerpo bloquea cruzadamente la unión de un anticuerpo, tal como 2C4 o

Pertuzumab, a HER2. Alternativa, o adicionalmente, puede llevarse a cabo un mapeo de epítopos por métodos conocidos en el arte, y/o se puede estudiar la estructura anticuerpo-HER2 (Franklin *et al.* Cancer Cell 5:317-328 (2004)) para ver qué dominio(s) de HER2 se liga/ligan por el anticuerpo.

(ix) *Inmunosconjugados*

La invención concierne además a inmunosconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (*por ejemplo*, 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 inmunosconjugados se han descrito más arriba. Conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, una maitansina (Patente de los Estados Unidos No. 5,208,020), un tricoteno, y CC1065 se contemplan igualmente en esta solicitud.

En una incorporación preferida de la invención, el anticuerpo se conjuga con una o más moléculas de maitansina (*por ejemplo*, alrededor de 1 a alrededor de 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede, *por ejemplo*, convertirse en May-SS-Me, el cual puede reducirse a May-SH3 y hacerse reaccionar con anticuerpo modificado (Chari *et al.* Cancer Research 52: 127-131 (1992)), para generar un inmunosconjugado maitansinoide-anticuerpo.

Otro inmunosconjugado de interés comprende un anticuerpo HER2 conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir cortes de ADN bicatenario en concentraciones sub-picomolares. Análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ_1^I (Hinman *et al.*, Cancer Research 53: 3336-3342 (1993) y Lode *et al.*, Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)). Véase, también, las Patentes de los Estados Unidos No. 5,714,586; 5,712,374; 5,264,586; y 5,773,001 expresamente incorporadas en esta solicitud por referencia.

Toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos, que pueden usarse, incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina de la difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la 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. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una deoxiribonucleasa; DNasa).

Una variedad de isótopos radioactivos se encuentra disponible para la producción de anticuerpos HER2 radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu.

Conjugados del anticuerpo y agente citotóxico pueden elaborarse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato dimetilico), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutarealdehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolien 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen 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 a ácidos, un enlazante sensible a peptidasa, un enlazante dimetilico o un enlazante que contenga disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992)).

Alternativamente, puede elaborarse una proteína de fusión que comprenda el anticuerpo HER2 y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica.

En todavía otra incorporación, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en pre-direccionamiento 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 ejemplo*, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (*por ejemplo*, un radionucleótido).

(x) *Otras modificaciones de anticuerpo*

Aquí se contemplan otras modificaciones de anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo puede enlazarse a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, *por ejemplo*, polietilen glicol, polipropilen glicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilen glicol y polipropilen glicol. En igual forma, el 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, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas y otras formulaciones apropiadas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, *por ejemplo*, con el fin de intensificar la citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede lograrse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa, o adicionalmente, puede(n) introducirse en la región Fc un residuo(s) de cisteína, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro intracadena en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o creciente eliminación celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, *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 *et al.*, *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 *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función ADCC mejorada en la presencia de células efectoras humanas, donde los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en su región Fc. Preferiblemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc. Preferiblemente la región Fc alterada es una región Fc de IgG1

humana, que comprende o consta de sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones.

Anticuerpos con unión C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) se describen en WO99/51642, Patente de los Estados Unidos No. 6,194,551BI, Patente de los Estados Unidos No. 6,242,195BI, Patente de los Estados Unidos No. 6,528,624BI y Patente de los Estados Unidos No. 6,538,124 (Idusogie *et al.*). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos.

Para incrementar la semivida sérica del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de salvamento al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5,739,277, por ejemplo. Tal como se emplea en esta solicitud, el término "epítipo de unión a receptor de salvamento" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (*por ejemplo*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula IgG. Anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y semividas incrementadas se describen también en WO00/42072 (Presta, L.).

También se contemplan anticuerpos genéticamente manipulados con tres o más (preferiblemente, cuatro) sitios de unión funcional a antígeno (Solicitud de los Estados Unidos No. US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

Los anticuerpos HER2 divulgados en esta solicitud pueden formularse además como liposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en el arte, tales como los descritos en Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); Patente de los Estados Unidos No. 4,485,045 y 4,544,545; y WO 1997/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Liposomas con tiempo de circulación mejorado 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 lipídica 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 *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257:286-288 (1982) mediante una reacción de

intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico se encuentra contenido opcionalmente en el liposoma. Véase Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484(1989).

(ix) *Anticuerpos ejemplares*

Anticuerpos ejemplares que pueden formularse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a los siguientes: anticuerpos anti-ErbB, incluidos anticuerpos anti-HER2, tales como los descritos con más detalle en esta solicitud; anticuerpos que se unen a un marcador de superficie de linfocito B, tal como CD19, CD20 (por ejemplo Rituximab (RITUXAN®) y 2H7 humanizado), CD22, CD40 ó BR3; anticuerpos que se unen a IgE, incluidos Omalizumab (XOLAIR®) disponible comercialmente de Genentech, E26 (Figs. 17A-B en esta solicitud), HAEI (Figs. 17A-B en esta solicitud), anticuerpo IgE con una sustitución de aminoácidos en la posición 265 de una región Fc del mismo (US 2004/0191244 A1), Hu-901 (Figs. 17A-B en esta solicitud), un anticuerpo IgE como en WO2004/070011, o un anticuerpo (incluidos fragmentos de anticuerpo y anticuerpos de longitud total) que comprenden los dominios variables de cualquiera de estos anticuerpos IgE. Véase, asimismo, Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623-2632 (1993); Publicación Internacional No. WO 95/19181; Patente de los Estados Unidos No. 5,714,338, expedida el 3 de febrero de 1998; Patente de los Estados Unidos No. 5,091,313, expedida el 25 de febrero de 1992; WO 93/04173 publicada el 4 de marzo de 1993; WO 99/01556 publicada el 14 de enero de 1999; y Patente de los Estados Unidos No. 5,714,338; anticuerpos que se unen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o un receptor del mismo, incluidos Bevacizumab (AVASTIN™), disponible comercialmente de Genentech, y Ranibizumab (LUCENTIS™); anticuerpos anti-IL-8 (St. John *et al.*, *Chest*, 103:932 (1993), y Publicación Internacional No. WO 95/23865); anticuerpos anti-PSCA (WO01/40309); anticuerpos anti-CD40, incluido S2C6 y variantes humanizadas de los mismos (WOOO/75348); anticuerpos anti-CD11a, incluidos efalizumab (RAPTIVA®) (Patente de los Estados Unidos No. 5,622,700, WO 98/23761, Steppe *et al.*, *Transplant Intl.* 4:3-7 (1991), y Hourmant *et al.*, *Transplantation* 58:377-380 (1994)); anticuerpos anti-CD18 (Patente de los Estados Unidos No. 5,622,700, expedida el 22 de abril de 1997, o como en WO 97/26912, publicada el 31 de julio de 1997); anticuerpo de receptor anti-Apo-2 (WO 98/51793 publicada el 19 de noviembre de 1998); anticuerpos anti-TNF- α cA2 (REMICADE®), CDP571 y MAK-195 (véase, Patente de los Estados Unidos No. 5,672,347 expedida el 30 de septiembre de 1997, Lorenz *et al.*, *J. Immunol.* 156(4):1646-1653 (1996), y

Dhainaut *et al.*, *Crit. Care Med.* 23(9):1461-1469 (1995)); Factor anti-Tisular (TF) (Patente Europea No. 0420 937 BI otorgada el 9 de noviembre de 1994); integrina $\alpha 4\beta 7$ anti-humana (WO 98/06248 publicada el 19 de febrero de 1998); anticuerpos anti-EGFR, incluido el anticuerpo 225 quimérico o humanizado como en WO 96/40210 publicada el 19 de diciembre de 1996; anticuerpos anti-CD3, tales como OKT3 (Patente de los Estados Unidos No. 4,515,893 expedida el 7 de mayo de 1985); anticuerpos anti-CD25 o anti-tac tales como CHI-621 (SIMULECT®) y (ZENAPAX®) (véase Patente de los Estados Unidos No. 5,693,762 expedida el 2 de diciembre de 1997); anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy *et al.*, *Arthritis Rheum.* 39(I):52-56 (1996)); anticuerpos anti-CD52 tales como CAMPATH-1H (Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-337 (1988); anticuerpos de receptor anti-Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc γ RI como en Graziano *et al.*, *J. Immunol.* 155(10):4996-5002 (1995); anticuerpos de antígeno anti-carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-14 (Sharkey *et al.*, *Cancer Res.* 55 (23 suplemento): 5935s-5945s (1995); anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama, incluidos huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani *et al.*, *Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman *et al.*, *Cancer Res.* 55(23 suplemento): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon tales como C242 (Litton *et al.*, *Eur J. Immunol.* 26 (I): 1-9 (1996)); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo AT 13/5 (Ellis *et al.*, *J. Immunol.* 155(2):925-937 (1995)); anticuerpos anti-CD33 tales como Hu M195 (Jurcic *et al.*, *Cancer Res.* 55(23 suplemento): 5908s-5910s (1995) y CMA-676 ó CDP771; anticuerpos anti-CD22 tales como LL2 o LymphoCide (Juweid *et al.*, *Cancer Res.* 55 (23 suplemento):5899s-5907s (1995); anticuerpos anti-EpCAM tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos anti-GpIIb/IIIa tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticuerpos anti-RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVTR®; anticuerpos anti-HIV tales como PRO542; anticuerpos anti-hepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticuerpo anti-CA 125 OvaRex; anticuerpo BEC2 de epítipo anti-idiotípico GD3; anticuerpo anti- $\alpha v\beta 3$ VITAXIN®; anticuerpo de carcinoma de células renales anti-humano tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-humano 17-1A (3622W94); anticuerpo de tumor colorrectal anti-humano (A33); anticuerpo de melanoma anti-humano R24 dirigido contra el gangliósido GD3; anticuerpos de carcinoma escamoso anti-humano (SF-25); y anticuerpos de antígeno de leucocitos anti-humano (HLA) tales como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1).

(xi) *Composiciones de variantes de anticuerpo*

La presente invención, en por lo menos un aspecto, concierne a formulaciones que comprenden una composición que contiene una mezcla de un anticuerpo de especie principal y una o más variantes del mismo. Donde el anticuerpo de especie principal une HER2, preferiblemente el anticuerpo HER2 (cualquiera o ambos de los anticuerpos HER2 de especie principal y su variante de anticuerpo) es uno que se une al Dominio II de HER2, inhibe la dimerización HER más efectivamente que Trastuzumab, y/o se une a un sitio heterodimérico de unión de HER2. La incorporación preferida en esta solicitud del anticuerpo de especie principal es uno que comprende las secuencias de aminoácidos pesadas variables y ligeras variables en SEQ ID Nos. 3 y 4 y, muy preferiblemente, que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada de SEQ ID No. 15 y 23, y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada de SEQ ID No. 16 y 24.

En una incorporación, la composición de anticuerpo HER2 formulada comprende una mezcla del anticuerpo HER2 de especie principal y una variante de secuencia de aminoácidos del mismo que contiene una extensión líder amino-terminal. Preferiblemente, la extensión líder amino-terminal es una cadena ligera de la variante de anticuerpo (por ejemplo en una o dos cadenas ligeras de la variante de anticuerpo). El anticuerpo HER2 de especie principal o la variante de anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena total o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab de $F(ab')_2$), pero preferiblemente ambos son anticuerpos de longitud total. La variante de anticuerpo en esta solicitud puede comprender una extensión líder amino-terminal en una cualquiera o más de sus cadenas ligeras o pesadas. Preferiblemente, la extensión líder amino-terminal es una o dos cadenas ligeras del anticuerpo. Preferiblemente, la extensión líder amino-terminal comprende o consta de VHS. La presencia de la extensión líder amino-terminal en la composición puede detectarse por varias técnicas analíticas incluidas, pero no limitadas a, análisis de secuencia N-terminal, análisis de heterogeneidad de carga (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis de zona capilar), espectrometría de masas, etc. La cantidad de la variante de anticuerpo en la composición varía generalmente desde una cantidad, que constituye el límite de detección de cualquier análisis (preferiblemente análisis de secuencia N-terminal) utilizado para detectar la variante, hasta una cantidad

menor que la cantidad de anticuerpo de especie principal. Generalmente, alrededor de 20% o menos (por ejemplo, desde alrededor de 1% a alrededor de 15%, por ejemplo desde 5% a alrededor de 15%) de las moléculas del anticuerpo en la composición comprenden una extensión líder amino-terminal. Tales cantidades porcentuales se determinan preferiblemente usando análisis cuantitativo de secuencia N-terminal o análisis de intercambio catiónico (preferiblemente usando una columna de intercambio catiónico débil, de alta resolución, tal como un columna de intercambio catiónico PROPAC WCX- 10™). Aparte de la variante de extensión líder amino-terminal, se contemplan alteraciones adicionales de secuencia de aminoácidos del anticuerpo de especie principal y/o variante, incluidos pero no limitados a, un anticuerpo que comprende un residuo lisina C-terminal en una o ambas de sus cadenas pesadas, una variante de anticuerpo desaminado, etc.

Más aún, el anticuerpo de especie principal o variante puede comprender además variaciones de glucosilación, ejemplos no limitantes de las cuales incluyen el anticuerpo HER2 que comprende una estructura de oligosacárido G1 o G2 unida a su región Fc, anticuerpo HER2 que comprende una fracción carbohidrato unida a su cadena ligera (por ejemplo, una o dos fracciones carbohidrato unidas a una o dos cadenas ligeras del anticuerpo), anticuerpo HER2 que comprende una cadena pesada no glucosilada.

III. Preparación de la Formulación

La presente invención provee, en un primer aspecto, una formulación farmacéutica estable que comprende un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo IgG1 humano o humanizado de longitud total, en amortiguador acetato de histidina, pH 5.5 a 6.5, preferiblemente pH 5.8 a 6.2. No obstante, el anticuerpo en la formulación puede ser un fragmento de anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno, tal como un fragmento Fab o F(ab')₂.

En otra incorporación, la invención concierne a una formulación farmacéutica que comprende, o consta esencialmente de, un anticuerpo IgG1 de longitud total, susceptible a desamidación o agregación en una cantidad desde alrededor de 10mg/mL a alrededor de 250mg/mL; amortiguador acetato de histidina, pH 5.5 a 6.5; sacárido seleccionado del grupo conformado por trehalosa y sacarosa, en una cantidad desde alrededor de 60mM a alrededor de 250mM; y polisorbato 20 en una cantidad desde alrededor de 0.01% a alrededor de 0.1%.

En todavía otra incorporación, la invención provee una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une al dominio II de HER2 en un amortiguador histidina con un pH desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5, un sacárido y un surfactante. Por ejemplo, la formulación puede comprender Pertuzumab en una cantidad desde alrededor de 20mg/mL a alrededor de 40mg/mL, amortiguador acetato de histidina, sacarosa, y polisorbato 20, en donde el pH de la formulación es desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5

En otro aspecto, la invención provee una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo DR5 en un amortiguador histidina con un pH desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5, un sacárido y un surfactante. Por ejemplo, tal formulación puede comprender Apomab en una cantidad desde alrededor de 10mg/mL a alrededor de 30mg/mL, amortiguador acetato de histidina, trehalosa, y polisorbato 20, en donde el pH de la formulación es desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5.

La formulación es especialmente útil para anticuerpos que son susceptibles a desamidación y/o agregación y/o fragmentación, porque el amortiguador retarda la desamidación y/o agregación y/o fragmentación del anticuerpo formulado en ella. Adicionalmente, a diferencia de otros amortiguadores de histidina preparados usando HCl, el amortiguador acetato de histidina carece del ión cloruro, lo que se descubrió que es benéfico en este caso, en el sentido que este amortiguador, cuando se combinó con sacárido, tuvo el mismo efecto protector sobre un anticuerpo que el polisorbato 20, y fue estable y compatible con el almacenamiento en recipientes de acero inoxidable. En consecuencia, además de la formulación *per se*, que comprende el anticuerpo susceptible a desamidación, agregación y/o fragmentación, la invención provee un método para reducir la desamidación, agregación y/o fragmentación de un anticuerpo monoclonal terapéutico (por ejemplo, relativas a una composición con un pH diferente o en un amortiguador diferente), que comprende formular el anticuerpo en un amortiguador de acetato de histidina, pH 5.5 a 6.5. En esta incorporación, se puede determinar la desamidación, agregación y/o fragmentación antes y después de formular el anticuerpo, demostrando el anticuerpo formulado desamidación, agregación y/o fragmentación aceptables en la formulación y luego de su almacenamiento.

El anticuerpo en la formulación puede unir un antígeno, incluidos pero no limitados a: HER2, CD20, IgE, DR5, BR3 y VEGF.

Donde el anticuerpo formulado une HER2, éste es preferiblemente uno que se une al Dominio de HER2, inhibe la dimerización HER más efectivamente que

Trastuzumab, y/o se une a un sitio heterodimérico de unión de HER2. La incorporación, preferida en esta solicitud, de un anticuerpo HER2 formulado es uno que comprende las secuencias de aminoácidos pesadas variables y ligeras variables en SEQ ID Nos. 3 y 4 y, muy preferiblemente, que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera en SEQ ID Nos. 15 y 16 (Pertuzumab).

Ejemplos de anticuerpos CD20 que pueden formularse en esta solicitud incluyen: "C2B8" que actualmente se denomina "Rituximab" ("RITUXAN®") disponible comercialmente de Genentech (véase también Patente de los Estados Unidos No. 5,736,137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio-[90], designado "Y2B8" o "Ibritumotnab Tiuxetan" ZEVALIN® obtenible comercialmente de Biogen-Idec (véase igualmente la Patente de los Estados Unidos No. 5,736,137, expresamente incorporada aquí por referencia); IgG2a "B1" murino, también llamado "Tositumomab," opcionalmente marcado con ¹³¹I para generar el anticuerpo "¹³¹I-B1" (tositumomab yodo I¹³¹, BEXXAR™) (Patente de los Estados Unidos No. 5,595,721, expresamente incorporada aquí por referencia); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (*Press et al., Blood* 69(2):584-591 (1987)) y sus variantes, incluidos 1F5 "**framework patched**" o humanizado (WO 2003/002607, Leung, S.) ATCC Depósito HB-96450); anticuerpo 2H7 murino y 2H7 quimérico (Clark *et al., PNAS* 82: 1766-1770 (1985); Patente de los Estados Unidos No. 5,500,362, expresamente incorporada aquí por referencia); 2H7 humanizado; huMax-CD20 (WO 04/035607, Genmab, Denmark); AME-133 (Applied Molecular Evolution); anticuerpo A20 o sus variantes tales como anticuerpo A20 quimérico o humanizado (cA20, hA20, respectivamente) (US 2003/0219433, Immunomedics); y anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-CI o NU-B2 disponibles de the International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al., In: Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))).

En la incorporación preferida de un anticuerpo CD20 formulado, el anticuerpo CD20 es un anticuerpo 2H7 humanizado. Anticuerpos 2H7 humanizados preferidos en esta solicitud son 2H7v16 y 2H7v511. El 2H7v16 humanizado puede ser un anticuerpo intacto o fragmento de anticuerpo que comprende las secuencias pesadas variables y ligeras variables en Figs. 18A-B (SEQ ID Nos. 26 y 29). Donde el anticuerpo 2H7v16 humanizado es un anticuerpo de longitud total, preferiblemente comprende las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras con SEQ ID Nos. 63 y 65.

Donde el anticuerpo une VEGF, preferiblemente comprende las secuencias de dominio variable como se ilustra en Fig. 19. El anticuerpo anti-VEGF muy preferido es el anticuerpo humanizado IgG1 de cadena total, Bevacizumab (AVASTIN™), comercialmente disponible de Genentech.

Donde el anticuerpo formulado une IgE, se selecciona preferiblemente del grupo conformado por: E25, Omalizumab (XOLAIR®) comercialmente disponible de Genentech (véanse además las Figs. 17A-B), E26 (Figs. 17A-B en esta solicitud), HAEI (Figs. 17A-B en esta solicitud), anticuerpo IgE con una sustitución de aminoácido en la posición 265 de su región Fc (US 2004/0191244 A1), Hu-901 (Figs. 17A-B en esta solicitud), un anticuerpo IgE como en WO200M7070011, o un anticuerpo (incluidos fragmentos de anticuerpo y anticuerpos de longitud total) que comprende los dominios variables de cualquiera de esos anticuerpos IgE.

Donde el anticuerpo se une a un receptor en la superfamilia de factor de necrosis tumoral (TNF) o a un receptor de muerte, se une preferiblemente a DR5, y preferiblemente es un anticuerpo agonista. Publicaciones en esta área incluyen Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-821 (1997), Pan *et al.*, *Science*, 277:815-818 (1997), WO98/51793 publicada el 19 de noviembre de 1998; WO98/41629 publicada el 24 de septiembre de 1998; Screaton *et al.*, *Curr. Biol.*, 7:693-696 (1997); Walczak *et al.*, *EMBO J.*, 16:5386-5387 (1997); Wu *et al.*, *Nature Genetics*, 17:141-143 (1997); WO98/35986 publicada el 20 de agosto de 1998; EP870,827 publicada el 14 de octubre de 1998; WO98/46643 publicada el 22 de octubre de 1998; WO99/02653 publicada el 21 de enero de 1999; WO99/09165 publicada el 25 de febrero de 1999; WO99/11791 publicada el 11 de marzo de 1999; US 2002/0072091 publicada el 13 de agosto de 2002; US 2002/0098550 publicada el 7 de diciembre de 2001; US 6,313,269 expedida 6 de diciembre de 2001; US 2001/0010924 publicada el 2 de agosto de 2001; US 2003/0125540 publicada el 3 de julio de 2003; US 2002/0160446 publicada el 31 de octubre de 2002, US 2002/0048785 publicada el 25 de abril de 2002; US 6,342,369 expedida en febrero de 2002; US 6,569,642 expedida 27 de mayo de 2003, US 6,072,047 expedida 6 de junio de 2000, US 6,642,358 expedida el 4 de noviembre de 2003; US 6,743,625 expedida el 1 junio de 2004. El anticuerpo DR5 muy preferido es Apomab.

Cada una de las formulaciones ya anotadas comprende un amortiguador, preferiblemente un amortiguador de histidina y, muy preferiblemente, un amortiguador de acetato de histidina con un pH de 5.5 a 6.5, preferiblemente 5.8 a 6.2, por ejemplo aproximadamente 6.0. La concentración del amortiguador es

104
97

dictada, por lo menos en parte, por el pH deseado. Concentraciones ejemplares para el amortiguador están en el rango desde alrededor de 1mM a alrededor de 200mM, preferiblemente desde alrededor de 10mM a alrededor de 40mM, muy preferiblemente alrededor de 20mM.

La concentración de anticuerpo en la formulación está preferiblemente en el rango desde alrededor de 10mg/mL a alrededor de 250mg/mL. La concentración de anticuerpo puede determinarse basándose en el uso previsto y el modo de administración de la formulación. Por ejemplo, donde la formulación es para administración i.v. (por ejemplo, un anticuerpo HER2), la concentración de anticuerpo en la formulación es preferiblemente desde alrededor de 20mg/mL a alrededor de 40mg/mL. En la formulación ejemplificada de Pertuzumab prevista para administración intravenosa (i.v.), la concentración de anticuerpo fue desde alrededor de 20mg/mL a alrededor de 40mg/mL, muy preferiblemente alrededor de 30mg/mL.

Donde el anticuerpo es para administración SQ o IM (por ejemplo, para un anticuerpo anti-IgE) pueden desearse concentraciones más elevadas del anticuerpo. Tales concentraciones de anticuerpo sustancialmente elevadas pueden ser desde alrededor de 50mg/mL a alrededor de 250mg/mL, o desde alrededor de 80mg/mL a alrededor de 250mg/mL, o desde alrededor de 100mg/mL a alrededor de 200mg/mL.

Donde la formulación comprende un anticuerpo DR5, tal como Apomab, concentraciones ejemplares de anticuerpo son desde alrededor de 10mg/mL a alrededor de 30mg/mL, por ejemplo alrededor de 20mg/mL de anticuerpo DR5; siendo útil tal formulación para administración intravenosa.

La formulación para administración es preferiblemente una formulación acuosa (no liofilizada) y no se ha sometido a liofilización previa. Aunque la formulación puede liofilizarse, preferiblemente no se liofiliza. No obstante, el congelamiento de la formulación acuosa, sin secamiento simultáneo que ocurre durante el secamiento por congelamiento, se contempla específicamente en esta solicitud, facilitando su almacenamiento a más largo plazo, por ejemplo en un recipiente de acero inoxidable.

Además, la formulación comprende preferiblemente un sacárido, muy preferiblemente un disacárido, tal como trehalosa o sacarosa. El sacárido se incluye generalmente en una cantidad que reduce la formación de agregados solubles, tal como la que ocurre luego de congelamiento/descongelamiento. Concentraciones ejemplares de sacárido están en el rango desde alrededor de

104
98

10mM a alrededor de 1M, por ejemplo desde alrededor de 60mM a alrededor de 250mM y, muy preferiblemente, alrededor de 120mM para una formulación de anticuerpo HER2 y, alrededor de 240mM para una formulación de anticuerpo DR5.

Aunque se ha descubierto en esta solicitud que una formulación que comprende amortiguador de acetato de histidina y sacárido era estable, la formulación comprende además opcionalmente un surfactante, tal como polisorbato, muy preferiblemente polisorbato 20. El surfactante se incluye generalmente en una cantidad que reduzca la formación de agregados insolubles (tal como la que ocurre luego de agitar). La concentración de surfactante es preferiblemente desde alrededor de 0.0001% a alrededor de 1.0%, muy preferiblemente desde alrededor de 0.01% a alrededor de 0.1%, por ejemplo alrededor de 0.02%.

Opcionalmente, la formulación no contiene una cantidad tonicificante de una sal, tal como cloruro de sodio.

La formulación es generalmente estéril, y esto puede lograrse, de acuerdo con los procedimientos conocidos por la persona experta, para generar formulaciones farmacéuticas estériles apropiadas para administración a sujetos humanos, incluida filtración a través de membranas de filtración estéril, antes o luego de la preparación de la formulación.

Más aún, deseablemente la formulación es una que se ha demostrado que es estable luego del almacenamiento. Se dispone de varios análisis de estabilidad al alcance del profesional experto para confirmar la estabilidad de la formulación. Por ejemplo, la formulación puede ser una que se haya descubierto que es estable luego del almacenamiento: a alrededor de 40°C durante por lo menos 4 semanas; a alrededor de 5°C o alrededor de 15°C durante por lo menos 3 meses o por lo menos 1 año; y/o alrededor de -20°C durante por lo menos 3 meses. La estabilidad puede probarse evaluando la estabilidad física, la estabilidad química, y/o la actividad biológica del anticuerpo en la formulación alrededor del tiempo de formulación, así como luego del almacenamiento a las temperaturas anotadas. La estabilidad física y/o química puede evaluarse cualitativa y/o cuantitativamente en una variedad de diferentes modos, incluida la evaluación de formación de agregados (por ejemplo usando cromatografía de exclusión de tamaño, midiendo la turbiedad, y/o por inspección visual); evaluando la heterogeneidad de carga usando cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis de zona capilar; análisis de secuencia amino-terminal o carboxi-terminal; análisis espectrométrico de masas; análisis SDS-PAGE para comparar anticuerpo intacto y reducido;

análisis por mapeo peptídico (por ejemplo tríptico o LYS-C); evaluar la actividad biológica o función de unión a antígeno del anticuerpo; etc. La inestabilidad puede resultar en agregación, desamidación (por ejemplo, desamidación Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación Met), isomerización (por ejemplo, isomerización Asp), corte/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de la región de unión flexible), formación de succinimida, cisteína(s) no apareada, extensión N-terminal, procesamiento C-terminal, diferencias de glucosilación, etc. La actividad biológica o la función de unión a antígeno pueden evaluarse usando varias técnicas al alcance del profesional experto.

Como ya se anotó, el congelamiento de la formulación se contempla específicamente en esta solicitud. En consecuencia, la formulación puede probarse con respecto a estabilidad luego del congelamiento y descongelamiento.

Por lo tanto, la invención provee asimismo un método de elaborar una formulación farmacéutica, que comprende preparar la formulación como se describe en esta solicitud, y evaluar la estabilidad física, la estabilidad química, o la actividad biológica del anticuerpo monoclonal en la formulación.

En la incorporación preferida, la formulación se provee dentro de un frasquito con un tapón perforable por una jeringa, preferiblemente en forma acuosa. Deseablemente, el frasquito se almacena a alrededor de 2-8°C hasta cuando se administra a un sujeto necesitado de ello. El frasquito puede ser por ejemplo un vial de 20cc (por ejemplo para una dosis de 420mg) o un frasquito de 50cc (por ejemplo para una dosis de 1.050mg). Para un anticuerpo DR5, tal como Apomab, la formulación puede proveerse en un frasquito de vidrio de 5cc (por ejemplo, 5.5ml de capacidad).

En otra incorporación, la formulación se provee dentro de un recipiente de acero inoxidable. Opcionalmente, la formulación en el recipiente de acero inoxidable se congela y no se seca por congelamiento.

Uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) pueden incluirse en la formulación, siempre que no afecten adversamente las características deseadas de la formulación. Vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los recipientarios en las posologías y concentraciones empleadas e incluyen: agentes amortiguadores adicionales; co-disolventes; antioxidantes incluidos ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como

10X

100

poliésteres; preservantes; y/o iones contrarios formadores de sales, tales como sodio.

IV. Tratamiento con la Formulación de Anticuerpo

En una incorporación, la invención provee un método de tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, método que comprende administrar la formulación descrita en esta solicitud a un sujeto en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad o trastorno.

Donde el anticuerpo en la formulación se une a HER2, se usa preferiblemente para tratar cáncer. El cáncer comprenderá generalmente células que expresan HER2, de modo que el anticuerpo HER2 en esta solicitud está en capacidad de unirse a las células cancerosas. En consecuencia, la invención en esta incorporación concierne a un método para tratar cáncer que expresa HER2 en un sujeto, método que comprende administrar la formulación farmacéutica del anticuerpo HER2 al sujeto en una cantidad efectiva para tratar cáncer. Varias neoplasias malignas que pueden tratarse con la composición se enumeran en la sección Definiciones de más arriba.

Se contempla asimismo que la formulación de anticuerpo HER2 pueda usarse para tratar varias enfermedades no malignas o trastornos, tales como una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, psoriasis); endometriosis; escleroderma; restenosis; pólipos tales como pólipos del colon, pólipos nasales o pólipos gastrointestinales; fibroadenoma; enfermedad respiratoria (véase definición más arriba); colecistitis; neurofibromatosis; enfermedad de riñón poliquístico; enfermedades inflamatorias; trastornos de la piel incluidas psoriasis y dermatitis; vasculopatía (véase definición más arriba); afecciones que involucran proliferación anormal de las células epiteliales vasculares; úlceras gastrointestinales; enfermedad de Ménétrier, adenomas secretores o síndrome de pérdida de proteína; trastornos renales; trastornos angiogénicos; enfermedad ocular tal como degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de presunta histoplasmosis ocular, neovascularización retiniana de retinopatía diabética proliferativa, vascularización retiniana, retinopatía diabética, o degeneración macular relacionada con la edad; patologías asociadas con los huesos tales como osteoartritis, raquitismo y osteoporosis; daño luego de un episodio isquémico cerebral; enfermedades fibróticas o de edemia tales como cirrosis hepática,

fibrosis pulmonar, sarcoidosis, tiroiditis, síndrome sistémico por hiperviscosidad, enfermedad de Osler Weber-Rendu, enfermedad pulmonar oclusiva crónica, o edema a raíz de quemaduras, trauma, radiación, apoplejía, hipoxia o isquemia; reacción de hipersensibilidad de la piel; retinopatía diabética y nefropatía diabética; síndrome de Guillain-Barré; enfermedad de injerto contra el anfitrión o rechazo de transplante; enfermedad de Paget; inflamación de los huesos o las articulaciones ("**bone or joint inflammation**"); fotoenvejecimiento (por ejemplo, causado por radiación UV de la piel humana); hipertrofia prostática benigna; ciertas infecciones microbianas incluidos patógenos microbianos seleccionados de adenovirus, hantavirus, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. y *Bordetella pertussis*; trombos causados por agregación plaquetaria; afecciones reproductivas tales como endometriosis, síndrome de hiperestimulación ovárica, preeclampsia, metrorragia funcional, o menometrorragia; sinovitis; ateroma; nefropatías agudas y crónicas (incluidas glomerulonefritis proliferativa y nefropatía inducida por diabetes); eccema; formación de cicatrices hipertróficas; choque endotóxico e infección fúngica; poliposis por adenomatosis familiar; enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinosa y degeneración cerebelar); síndromes mielodisplásicos; anemia aplásica; lesión isquémica; fibrosis del pulmón, riñón o hígado; enfermedad de hipersensibilidad mediada por linfocitos T; estenosis pilórica hipertrófica infantil; síndrome obstructivo urinario; artritis psoriática; y tiroiditis de Hashimoto. Indicaciones no malignas preferidas para terapia en esta solicitud incluyen psoriasis, endometriosis, escleroderma, vasculopatía (por ejemplo, restenosis, arterosclerosis, arteriopatía coronaria, o hipertensión), pólipos del colon, fibroadenoma o enfermedad respiratoria (por ejemplo, asma, bronquitis crónica, bronquiectasia o fibrosis quística).

Donde el anticuerpo en la formulación se une a un marcador de superficie de linfocito B tal como CD20 ó B R3, la formulación puede usarse para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B, tal como NHL o CLL, una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de injerto, o para bloquear una respuesta inmunitaria a un antígeno extraño, tal como un anticuerpo, una toxina, un vector vírico de terapia génica, un injerto, un agente infeccioso, o un aloantígeno (véase WO 01/03734, Grillo-Lopez *et al.*).

Donde el anticuerpo en la formulación es un anticuerpo IgE, puede usarse para tratar un trastorno mediado por IgE (USSN 2004/0197324 Al, Liu and Shire),

tal como asma alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, gastroenteropatía alérgica, hipersensibilidad, eccema, urticaria, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedad parasitaria, síndrome de hiper-IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoplasia tímica, mieloma IgE, y reacción injerto contra el anfitrión.

Anticuerpos que se unen a un receptor en la superfamilia TNF (por ejemplo, que se unen a DR5), o que se unen a VEGF (o a un receptor del mismo), pueden usarse para tratar cáncer, varias formas de los cuales se describen en la sección Definiciones más arriba. Preferiblemente, el cáncer tratado con una formulación de anticuerpo DR5 es un tumor sólido o NHL.

Donde la indicación es cáncer, el paciente puede tratarse con una combinación de la formulación de anticuerpo, y un agente quimioterapéutico. La administración combinada incluye co-administración o administración concurrente, usando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y administración consecutiva en cualquier orden, en donde preferiblemente hay un período de tiempo mientras ambos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. En consecuencia, el agente quimioterapéutico puede administrarse antes o después la administración de la composición. En esta incorporación, el mejor momento entre por lo menos una administración del agente quimioterapéutico y por lo menos una administración de la composición es preferiblemente aproximadamente 1 mes o menos y, muy preferiblemente aproximadamente 2 semanas o menos. Alternativamente, el agente quimioterapéutico y la composición se administran concurrentemente al paciente, en una formulación única o formulaciones separadas.

El tratamiento con la formulación resultará en una mejora en los signos o síntomas de cáncer o la enfermedad. Por ejemplo, donde la enfermedad que se está tratando es cáncer, tal terapia puede resultar en una mejora en la supervivencia (supervivencia total y/o supervivencia libre de evolución) y/o puede resultar en una respuesta clínica objetiva (parcial o completa). Más aún, el tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico y la formulación de anticuerpo puede resultar en un beneficio terapéutico sinérgico, o más que aditivo, al paciente.

Preferiblemente, el anticuerpo en la formulación administrada es un anticuerpo desnudo. No obstante, el anticuerpo administrado puede conjugarse con un agente citotóxico. Preferiblemente, el inmunoconjugado y/o antígeno al cual se une se internaliza/internalizan por la célula, resultando en una eficacia

terapéutica incrementada del inmunoconjugado en eliminar la célula cancerosa a la cual se une. En una incorporación preferida, el agente citotóxico toma como diana o interfiere el ácido nucleico en la célula cancerosa. Ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

La formulación se administra a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como inyección intravenosa rápida o por infusión continua durante un período de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa, intramuscular o subcutánea de la composición de anticuerpo, siendo muy preferida la administración intravenosa.

Para aplicación subcutánea, la formulación puede administrarse con jeringa; aparato de inyección (por ejemplo, el aparato INJECT-EASE™ y GENJECT™); pluma inyectora (tales como la GENPEN™); aparato sin aguja (por ejemplo, MEDDECTOR™ y BIOJECTOR™); o sistema de aplicación de parche subcutáneo.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la posología apropiada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se define anteriormente, la gravedad y ciclo de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico al cuidado del paciente. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una sola vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo de gravedad de la enfermedad, alrededor de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0.1-20mg/kg) de anticuerpo HER2 o DR5 es una posología candidata inicial para administración al paciente, si, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. La posología del anticuerpo estará generalmente en el rango desde alrededor de 0.05mg/kg a alrededor de 10mg/kg. Si se administra un agente quimioterapéutico, éste se administra usualmente en posologías conocidas para él, u opcionalmente se disminuye debido a la acción combinada de los fármacos o efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico. La preparación y pautas posológicas para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o determinarse empíricamente por el profesional experto. La preparación y pautas

posológicas para tal quimioterapia se describen también en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con el anticuerpo incluidos, pero no limitados a: un segundo (tercero, cuarto, etc.) agente(s) quimioterapéutico (es decir, "cócteles" de diferentes agentes quimioterapéuticos); otro anticuerpo monoclonal; un agente inhibidor de crecimiento; un agente citotóxico; un agente quimioterapéutico; un fármaco dirigido a EGFR; inhibidor de tirosina cinasa; un agente anti-angiogénico; y/o citocina; etc.

Aparte de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a resección quirúrgica de células cancerosas y/o terapia de radiación.

V. Artículos de Fabricación

En otra incorporación de la invención, se provee un artículo de fabricación que contiene la formulación farmacéutica de la presente invención y ofrece instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un envase. Envases apropiados incluyen, por ejemplo, frascos, frasquitos (por ejemplo, frasquitos de cámara dual), jeringas (tales como jeringas de cámara dual) y tubos de ensayo. El envase puede formarse de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene la formulación, y la etiqueta sobre, o asociada con, el envase puede indicar instrucciones de uso. El envase que contiene la formulación puede ser un frasquito multi-uso, que permite administraciones repetidas (por ejemplo de 2-6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos de envase con instrucciones de uso como se anota en la sección anterior.

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. No obstante, éstos no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la invención. Todas las citas de literatura y patentes se incorporan aquí por referencia.

EJEMPLOS

Formulaciones Líquidas Estables de Pertuzumab

Estos ejemplos describen el desarrollo y las pruebas de estabilidad de formulaciones líquidas estables que comprenden Pertuzumab en concentraciones de proteína en el rango desde alrededor de 10 mg/mL - 180 mg/mL. Las formulaciones seleccionadas tuvieron una baja turbiedad, y fueron estables física y químicamente. Se retiró un ión de cloruro de la formulación para reducir el riesgo de corrosión. La formulación era isotónica, y apropiada para aplicación subcutánea o intramuscular. La formación de agregados insolubles luego del esfuerzo de agitación se evitó usando formulación de acetato de histidina y sacarosa, sin la necesidad de incluir polisorbato 20.

Métodos Analíticos

Color, Apariencia y Claridad (CAC)

El color, apariencia y claridad de las muestras se determinaron mediante inspección visual de los frasquitos contra un fondo blanco y negro bajo luz fluorescente blanca a temperatura de la sala.

Mediciones de Concentración UV

Primero se diluyó la alícuota del producto líquido con amortiguador de formulación, de modo que la A_{max} cerca de 278 nm está en 0.5-1.0 unidades de absorbancia. La absorbancia UV de las muestras diluidas se midió en una cubeta de cuarzo con 1 cm longitud de trayectoria en un espectrofotómetro HP 8453. La absorbancia se midió a 278 nm y 320 nm. La absorbancia de 320 nm se usa para corregir la difusión de la luz de fondo, debida a agregados más grandes, burbujas y partículas. Las mediciones se calibraron contra el amortiguador de formulación. La concentración de proteína se determinó usando la absortividad de $1.50 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Mediciones de pH

Se midió el pH a temperatura de la sala usando un medidor de pH RADIOMETER COPENHAGEN PHM82™. La sonda usada fue un electrodo de referencia/vidrio combinado con un conector radiometer (Sigma, Cat# E-5759). Se usaron soluciones estándar de pH 4.01 y pH 7.00 (EM Science) para calibración del medidor de pH.

63
TT

Cromatografía de Intercambio Iónico (IEX)

Se empleó cromatografía de intercambio catiónico para medir variaciones en variantes de carga. Este análisis utiliza una columna DIONEX PROPAC WCX-10™ en un sistema HPLC HP 1100™. Las muestras se diluyeron a 1 mg/mL con la fase móvil A que contenía 20 mM MES a pH 6.0. Luego se cargaron 50 mL de muestras diluidas en la columna que se mantuvo a temperatura ambiente. Los picos se eluyeron con una gradiente NaCl superficial usando fase móvil B que contenía 20 mM MES, 250 mM NaCl, pH 6.0. El eluyente se monitoreó a 280 nm. Los datos se analizaron usando software HP CHEMSTATION™ (Rev A08.03).

Electroforesis de Zona Capilar (CZE)

La pureza de los fragmentos Fab y F(ab')₂ se determinó por CZE. Este análisis se ejecutó en un sistema de electroforesis capilar BIORAD BIOFOCUS™ 3000™ con un capilar BIOCAP XL™, 50 µm I.D., longitud total 44.6 cm y 40 cm al detector.

Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC)

Se utilizó cromatografía de exclusión de tamaño para cuantificar agregados y fragmentos. Este análisis utiliza una columna TSK G3000 SWXL™, 7.8 x 300 mm y se ejecuta en un sistema HPLC HP 1100™. Se diluyeron muestras a 10 mg/mL con la fase móvil y el volumen de inyección fue de 20 µL. La fase móvil fue 100 mM K₂HPO₄ a pH 6.8 y la proteína se eluyó con una gradiente isocrática a 0.5 mL/minuto durante 45 minutos. Se monitoreó la absorbancia del eluyente a 280 nm. La integración se realizó usando software HP CHEMSTATION™ (Rev. A08.03).

Actividad Biológica

Se determinó la actividad biológica de Pertuzumab midiendo su capacidad de inhibir la proliferación de la línea de células de cáncer de mama humano MDA-MB-175-VII.

EJEMPLO 1

Fragmentos de anticuerpo Fab y F(ab')₂ Pertuzumab se formularon con una concentración de proteína de 1.0 mg/mL en las siguientes condiciones de amortiguador:

114

107

- 10 mM citrato, 140 mM NaCl, pH 4.0;
- 10 mM succinato, 140 mM NaCl, pH 5.0;
- 10 mM succinato, 140 mM NaCl, pH 6.0;
- 10 mM histidina, 140 mM NaCl, pH 7.0; y
- 10 mM glicilglicina, 140 mM NaCl, pH 8.0.

Cada formulación se filtró, luego se repartió en alícuotas en frasquitos de vidrio tipo I WHEATON™ USP de 3 cc sellados con tapones de butilo gris recubiertos con TEFLON™. Las muestras se almacenaron a 40 ± 2 °C. Los análisis de estabilidad de producto farmacéutico mostraron que los Fab y F(ab')₂ fueron más estables entre pH 5.0 y 6.0.

Tabla 2. Efecto del pH sobre la degradación de Fab o F(ab')₂ almacenadas a 40°C

pH de la formulación	Fab		F(ab') ₂	
	CZE % Pico Principal	CZE % Pico Principal	CZE % Pico Principal	CZE % Pico Principal
4.0	74.1	96.7	43.6	89.4
5.0	83.2	96.4	65.4	94.0
6.0	82.9	96.2	69.0	92.3
7.0	83.9	96.4	62.3	91.3
8.0	72.7	96.4	49.2	89.8

EJEMPLO 2

Pertuzumab se formuló en 20 mM de amortiguador de acetato de histidina con 120 mM sacarosa y 0.02 % polisorbato 20. Los pH de las formulaciones se ajustaron con ácido acético a un pH final entre 5.0 y 7.0. La concentración de proteína fue de 30 mg/mL. Cada formulación se envasó en frasquitos de vidrio tipo I USP de 3 cc y se almacenaron a 40°C para análisis de estabilidad. Los resultados mostraron que Pertuzumab fue muy estable alrededor de pH 6.0.

115
108

Tabla 3. Efecto del pH sobre la degradación de Pertuzumab almacenado a 40°C

pH de la Formulación	Temperatura (°C)	Tiempo de Almacenamiento (semanas)	SEC % Monómero	IEX % Pico Principal
5.0	40	2	99.4	57.4
5.5	40	2	99.4	59.2
6.0	40	2	99.4	60.6
6.5	40	2	99.3	60.5
7.0	40	2	99.1	54.0
5.0	40	4	97.3	48.1
5.5	40	4	99.1	50.5
6.0	40	4	99.1	53.3
6.5	40	4	99.0	52.3
7.0	40	4	98.6	42.3

EJEMPLO 3

Se prepararon formulaciones de Pertuzumab con una concentración de proteína de 100 mg/mL en los siguientes excipientes:

- (1) 10 mM histidina-HCl, 240 mM sacarosa, 0.02% polisorbato 20, pH 6.0;
- (2) 10 mM acetato de histidina, 240 mM sacarosa, 0.02% polisorbato 20, pH 6.0;
- (3) 10 mM histidina-fosfato, 240mM sacarosa, 0.02% polisorbato 20, pH 6.0;
- (4) 10 mM histidina-sulfato, 240 mM sacarosa, 0.02% polisorbato 20 a pH 6.0.

Cada formulación se envasó en frasquitos de vidrio tipo I FORMA VITRUM™ USP WHEATON™ USP de 3 cc sellados con tapones de caucho butilo recubiertos con FLUROTEC™. Se almacenaron muestras a 30°C y 40°C, y se evaluó la estabilidad en cuanto a la calidad (CAC) y pureza (SEC, IEC). Los resultados de estabilidad mostraron que Pertuzumab en amortiguador de histidina-fosfato se degradó mucho más rápido en otros amortiguadores de histidina luego del almacenamiento a 40°C (Fig. 8 y Fig. 9).

109 716

EJEMPLO 4

Pertuzumab se concentró por ultrafiltración/diafiltración a varias concentraciones en los siguientes amortiguadores:

- (1) 20 mM acetato de histidina, pH 6.0;
- (2) 10 mM histidina-HCl, pH 6.0, y
- (3) 10 mM histidina-sulfato, pH 6.0.

La turbiedad de cada formulación se midió antes de la filtración. Los resultados, como se ilustran en Fig. 10, demostraron que muestras de Pertuzumab formuladas en acetato de histidina e histidina-HCl tuvieron menor cantidad de agregados insolubles que aquellos en amortiguador histidina-sulfato.

EJEMPLO 5

Pertuzumab se formuló a 30 mg/mL en 20 mM acetato de histidina, 120 mM sacarosa, 0.02 % polisorbato 20, pH 6.0. El Pertuzmab se envasó en recipientes miniatura de acero inoxidable 316L y HASTELLOY™. Todas las muestras se almacenaron a -20°C y 5°C y se evaluaron con respecto a la calidad (CAC), pureza (SEC, IEC) y consistencia (UV-Vis). Los análisis de estabilidad mostraron que Pertuzumab era estable en esta formulación luego del almacenamiento a -20°C y 5°C durante por lo menos 3 meses. La formulación libre de cloruro es compatible con el recipiente de acero inoxidable 316L y HASTELLOY™.

Tabla 4. Estabilidad de Pertuzumab en Recipientes de Acero Inoxidable

Recipientes	Temp. (°C)	Tiempo (Meses)	CAC	UV Spec. (mg/mL)	SEC (% Monómero)	IEC (% Pico Principal)
		0	Pass ^a	29.0	99.8	67.9
316L	-20	3	Pass	28.9	99.7	66.8
	5	3	Pass	28.7	99.7	66.8
HASTELLON™	-20	3	Pass	29.1	99.7	66.8
	5	3	Pass	28.8	99.7	67.7

a. Aprobación para Color, Apariencia y Claridad: Solución clara a ligeramente opalescente, incolora a amarillo pálido.

EJEMPLO 6

Pertuzumab se formuló usando filtración de flujo tangencial (TFF). La formulación final contiene 20 mM de acetato de histidina, 120 mM sacarosa, 0.02 % polisorbato 20, pH 6.0 con una concentración de proteína de 30 mg/mL. Las muestras se envasaron en un frasquito de vidrio tipo I FORMA VITRUM™ USP de 20 MI, tapados con los tapones de caucho de butilo 20 mm recubiertos con FLUROTEC™, y se sellaron con tapas flip-top de aluminio. Todas las muestras se almacenaron a -70°C, 5°C, 15°C, y se evaluó la estabilidad con respecto a la calidad (CAC), pureza (SEC, IEC), consistencia (UV- Vis), y potencia (Bioanálisis). Los resultados mostraron que Pertuzumab es estable en esta formulación luego del almacenamiento a 5°C y 15°C durante por lo menos 3 meses.

Tabla 5. Estabilidad de Pertuzumab en frasquitos de vidrio

Temperatura (°C)	Tiempo (Meses)	CAC	UV Spec. (mg/mL)	SEC (% Monómero)	IEC (% Pico Principal)	Bioanálisis (% Actividad específica)
	0	Pass	29.2	99.8	64.1	83
-70	1	Pass	29.7	99.8	65.2	92
	3	Pass	30.7	99.8	67.0	93
5	3	Pass	30.4	99.7	67.2	90
15	1	Pass	29.7	99.7	64.4	78
	3	Pass	30.4	99.7	65.5	93

EJEMPLO 7

Pertuzumab se formuló a 100 mg/mL en las siguientes condiciones de amortiguador:

- (1) 10 mM histidina-HCl, pH 6.0;
- (2) 10 mM histidina-HCl, 240 mM sacarosa, pH 6.0;
- (3) 20 mM succinato a pH 6.0; y

(4) 20 mM succinato, 240 mM sacarosa a pH 6.0.

Cada formulación se agregó con diferente concentración de polisorbato 20. Todas las muestras se envasaron en frasquitos de vidrio tipo I USP de 3 cc y se agitaron horizontalmente a 70 rpm a temperatura de la sala durante hasta 7 días. La estabilidad de cada muestra se evaluó en el punto de tiempo correspondiente al día 7 con respecto a la turbiedad. Los resultados demostraron que el uso de polisorbato 20 en la formulación final impidió efectivamente la formación de agregados insolubles. Véase Fig. 11.

EJEMPLO 8

Pertuzumab se preparó en las siguientes formulaciones:

- (1) 25 mg/mL Pertuzumab, 10 mM histidina-HCl, 240 mM sacarosa, pH 6.0;
- (2) 50 mg/mL Pertuzumab, 10 mM histidina-HCl, 240 mM sacarosa, pH 6.0;
- (3) 60 mg/mL Pertuzumab, 20 mM acetato de histidina, 120 mM sacarosa, pH 6.0.

Varias cantidades de polisorbato 20 se agregaron a cada formulación. Todas las muestras se envasaron en frasquitos de vidrio tipo I USP de 3 cc, y se agitaron horizontalmente a 70 rpm a temperatura de la sala durante hasta 7 días. Se evaluó la estabilidad física de cada muestra en el punto de tiempo correspondiente al día 7 con respecto a turbiedad. Los resultados demostraron que el uso de polisorbato 20 en formulación de histidina-HCl y sacarosa evitó efectivamente la formación de particulados insolubles. La formulación que contenía acetato de histidina y sacarosa parecieron tener el mismo efecto protector sobre la proteína, que el polisorbato 20. Véase Fig. 12.

EJEMPLO 9

Pertuzumab se formuló en la siguiente forma:

- (1) 100 mg/mL proteína, 10 mM histidina-HCl, pH 6.0;
- (2) 100 mg/mL proteína, 20 mM succinato, pH 6.0;
- (3) 60 mg/mL proteína, 20 mM acetato de histidina, pH 6.0.

Cada formulación se mezcló con diferentes cantidades de sacarosa. Todas las muestras se envasaron esterilizadamente en frasquitos de vidrio tipo I USP de 3 cc. Éstos se congelaron entonces a -70°C y se descongelaron a 5°C tres veces. La estabilidad física de cada muestra se determinó luego de los tres ciclos de congelamiento y descongelamiento. Los resultados demostraron que la sacarosa evita la formación de agregados solubles durante el proceso de congelamiento-descongelamiento. Véase Fig. 13.

119-
172

EJEMPLO 10

La formulación preferida de Pertuzumab para uso terapéutico consiste esencialmente de 30mg/mL Pertuzumab en 20mM de acetato de histidina, 120mM sacarosa, 0.02% polisorbato 20, con un pH 6.0.

Compuesto	Concentración	Cantidad/L
Pertuzumab	30 mg/mL	30 g
L-Histidina MW=155.16g/mol	20 mM	3.10 g
Ácido Acético Glacial MW=60.05g/mol Densidad=1.05g/cm ³	11.6 mM	0.66 mL
Sacarosa MW=342.3g/mol	120 mM	41.1 g
Polisorbato 20 Densidad=1.012g/cm ³	0.02% (p/v)	0.2 mL

MW: Peso Molecular

Configuración de frasquito con una dosis de 420mg:

Frasquito: vidrio tipo I Formal Vitrum de 20 cc

Tapón: 20mm DAIKYO GREY™, laminado con fluoro-resina

Tapa: 20mm aluminio flip top

Volumen de envasado: 14.50 mL

Aplicación: 14.0 mL Pertuzumab en bolsa de solución salina normal IV.

Configuración de frasquito con una dosis de 1.050mg:

Frasquito: vidrio tipo Formal Vitrum de 50 cc

Tapón: 20mm DAIKYO GREY™, laminado con fluoro-resina

Tapa: 20mm aluminio flip top

Volumen de envasado: 36.0 mL

Aplicación: 35.0 mL Pertuzumab e bolsa de solución salina normal IV.

EJEMPLO 11

Este ejemplo concierne a otra formulación de Pertuzumab que se ha usado en estudios clínicos de Fase I y Fase II. La composición consiste de 25 mg/ml

173 120

Pertuzumab, 10 mM de amortiguador Histidina-HCl, 240 mM sacarosa, 0.02% Polisorbato 20, pH 6.0.

EJEMPLO 12

La apoptosis celular es mediada por vías intrínsecas y extrínsecas. La quimioterapia puede causar lesión a las células y desencadenar apoptosis por la vía intrínseca en respuesta a lesión celular. Sin embargo, a menudo las células cancerosas desarrollan resistencia a la quimioterapia a través de mutaciones en el gen supresor de tumores p53 (Ashkenazi A. Targeting Death and Decoy Receptors of the Tumour-Necrosis Factor Superfamily. *Nature Reviews* 2:420- 430 (2002)). Los receptores de muerte, tales como DR4 y DR5, localizados en la superficie de células, desencadenan apoptosis mediante la vía extrínseca que no involucra p53. Moléculas agonísticas, tales como Apo2L, se unen a receptores DR4 y DR5 y activan las caspasas 8 y 10 a través del dominio de muerte asociado con Fas. Las caspasas 8 y 10 activan luego las caspasas 3, 6, y 7 para inducir apoptosis. La señalización molecular de receptores de muerte sobre las células tumorales tiene un potencial terapéutico para la eliminación de células cancerosas que son resistentes a terapias convencionales; y moléculas, como Apo2L, están experimentando en la actualidad evaluación clínica.

"Apomab" es una IgG1 humana derivada de CHO de longitud total, construida con una cadena ligera λ . Es un anticuerpo agonista contra DR5 que ha demostrado que induce apoptosis de varias líneas de células cancerosas. Estudios preclínicos usando un modelo de implante de tumor murino han demostrado que Apomab posee una reducción del tumor mejorada o similar, comparado con Apo2L. Apomab está siendo evaluado como agente anti-cáncer en las indicaciones de tumores sólidos avanzados y Linfoma no Hodgkiniano (NHL). Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada de Apomab usadas en estos experimentos se muestran en Figs. 27 y 28.

Preparación de Formulaciones de Anticuerpo

Apomab producido recombinantemente tuvo una concentración de proteína diluida y pH altos. El material se concentró a aproximadamente 20 mg/mL y se intercambió en 20 mM de amortiguador de acetato de sodio, pH 5.0 usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) Millipore Labscale con membrana MILLIPORE PELLICON™ XL, PLCGC10, 50 cm. Muestras de Apomab se formularon en varios sistemas amortiguadores que cubrían un rango de pH desde

4.0 a 7.0 usando acetato de sodio, acetato de histidina, y fosfato de sodio sin trehalosa y TWEEN 20® usando diálisis con una membrana de separación de 10.000 Da de peso molecular (Pierce, Inc). En la última diálisis se agregó trehalosa a 240 mM. Luego de la diálisis, se agregó 0.02% TWEEN 20™ a la formulación, y las muestras se filtraron con filtros de 0.22 µm (Millipore, Inc.). Un volumen de 0.5 mL de Apomab se envasó en frasquitos de vidrio esterilizados de 3 cc (Forma Vitrum, Inc.) y se selló con tapones de 13 mm (Daikyo, Inc). Se evaluó la estabilidad de la proteína a -70°C, 5°C, 30°C, y 40°C con almacenamiento durante hasta 3 meses.

Estabilidad de la Formulación de Apomab

Para las pruebas de estabilidad del producto farmacéutico, Apomab formulado a granel se envasó en frasquitos de vidrio FORMA VITRUM® de 5 cc. Los frasquitos se envasaron con 5.5 mL del anticuerpo formulado, equipados con tapones DAIKYO® de 20 mm, y se almacenaron a -70°C, 5°C, 30°C, y 40°C en la posición vertical.

Para las pruebas de estabilidad de la sustancia farmacéutica, Apomab formulado a granel se filtró esterilizadamente a través de un filtro de 0.22 µm, y 10 mL se envasaron en mini-recipientes de acero inoxidable 316L de 20 cc autoclavados. Los recipientes se pusieron en posición vertical a -20°C y 5°C. Se retiró asépticamente una alícuota de 1 mL de los mini-recipientes en intervalos especificados de tiempo para evaluar la calidad de la proteína. Los frasquitos de control eran alícuotas de 1 mL en frasquitos de vidrio de 3 cc almacenados a -20°C.

Color, Apariencia, y Claridad

La claridad, apariencia, y color de las muestras se evaluaron visualmente bajo luz fluorescente blanca usando una estación de inspección lumínica con fondo blanco y negro. Para análisis de la sustancia farmacéutica, se transfirieron muestras de los mini-recipientes a un frasco de vidrio de 3 cc para inspección.

PH

El pH se midió a temperatura de la sala con un electrodo semi-micro de pH THERMO ORION SURE-FLOW ROSS™ para medir amortiguadores o electrodo micro de pH de combinación THERMO ORION GLS™ para medir muestras de cribado de pH de proteína, una sonda de microelectrodo Beckman para muestras

de estabilidad en Toxicología. El medidor METERLAB™ pHM240 pH/Ion (Radiometer Analytical) se calibró cada día con estándares de amortiguador (EM Science) a pH 7 y pH 4.

Concentración

La concentración de proteína se determinó por espectroscopía de absorción ultravioleta usando un espectrofotómetro AGILENT 8453™. Las muestras se diluyeron con blancos de amortiguadores de formulación apropiada para producir una absorbancia desde 0.5 a 1.0. El instrumento se calibró con la solución diluyente y el espectro se barrió desde 240 a 500 nm. El valor de absorbancia a 320 nm se restó de la absorbancia a 279 nm para corregir la desviación y difusión de la luz. Las concentraciones de proteína se calcularon por la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. (mg/mL)} = \frac{(A_{279} - A_{320}) \times \text{factor de dilución}}{\text{coeficiente de absortividad en cm}^{-1}\text{mg/mL}^{-1}}$$

Inicialmente se determinó que el coeficiente de absortividad basado en la secuencia era $1.32 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/mL})^{-1}$ y este valor se utilizó para los estudios de cribado de pH. Un valor posterior de $1.7 \text{ cm}^{-1}(\text{mg/mL})^{-1}$ se determinó mediante análisis de aminoácidos y métodos de proteólisis, y este valor se empleó para el análisis de estabilidad de Apomab usado en estudios de Toxicología.

Cromatografía de Intercambio Iónico

Se llevó a cabo cromatografía de intercambio iónico en HPLC serie 1100 (Agilent Technologies, Inc.), equipada con un detector de arreglo de díodo. La cromatografía se realizó en una columna PROPAC WCX-10™ (Dionex) (4 x 250 mm) con un flujo de 0.5 mL/minuto y con una temperatura de la columna a 40°C. La fase móvil A fue 25 mM de fosfato de sodio, pH 6.5. La fase móvil B fue 100 mM de cloruro de sodio en el mismo amortiguador que la fase móvil A. La columna se equilibró con 100% de fase móvil A. Para muestras de cribado de pH se cargó una cantidad de 20 mg de Apomab en la columna, y se monitoreó la absorbancia a 214 nm. La proteína se eluyó de la columna con la siguiente gradiente:

123-
116

<u>Tiempo (min)</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>
0	100	0
50	0	100
51	100	0
70	100	0

Para el análisis de estabilidad del material utilizado en los estudios de Toxicología se cargó una cantidad de 30 mg de Apomab en la columna, y se monitoreó la absorbancia a 280 nm. La proteína se eluyó de la columna con la siguiente gradiente:

Gradiente:	<u>Tiempo (min)</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>
	0	100	0
	40.0	40	60
	41.0	0	100
	45.0	0	100
	45.1	100	0
	60.0	100	0

Cromatografía de Exclusión de Tamaño

La cromatografía de exclusión de tamaño se llevó a cabo en una HPLC serie 1100 (Agilent Technologies, Inc.), equipada con un detector de arreglo de díodo. Una cantidad de 50 µg Apomab se cargó en una columna TSK Gel 3000SWXL™ (7.8 x 300 mm) y se ejecutó con un caudal de 0.9 mL/minuto durante 20 minutos para muestras de cribado de pH y 0.5 mL/minuto durante 30 para muestras de estabilidad en Toxicología con 0.20 M de fosfato de potasio, 0.25 M de cloruro de potasio, pH 6.2 como fase móvil. La absorbancia se monitoreó a 280 nm.

Potencia

El propósito del bioanálisis de potencia era medir la capacidad de Apomab de eliminar células Colo205 usando ALAMARBLUE™. Colo205 es una línea de células de carcinoma del colon, que expresa los dos receptores de muerte DR5 y DR4. Este análisis incorpora un indicador de crecimiento fluorométrico/colorimétrico basado en la detección de actividad metabólica. ALAMARBLUE™ es un tinte redox que es azul y no fluorescente en estado

oxidado. La reducción metabólica intracelular lo convierte en un color rojo que es también fluorescente. Los cambios en color y fluorescencia son proporcionales a la actividad metabólica y al número de células vivas. La señal decreció al morir las células. Apomab se diluyó en medio con anti-Fc, y luego se agregaron las células Colo205 a las muestras de Apomab y se incubó a 37°C durante 48 horas. Se agregó ALAMARBLUE™ durante las últimas 2-3 horas. Se leyó la placa a 530 nm de excitación y 590 nm de emisión para obtener unidades de fluorescencia relativa (RFU). Los datos se analizaron mediante KALEIDAGRAPH™. Se generó una curva de dilución de la eliminación.

RESULTADOS

Estudio de Cribado de pH en la Formulación

Se estudió el efecto del pH sobre la estabilidad del anticuerpo usando Apomab producido de una línea de células estable no amplificada. Para este análisis, se formuló Apomab con 20 mg/mL de anticuerpo en un amortiguador de 20 mM de acetato de sodio con pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5; 20 mM de amortiguador de acetato de histidina con pH 6.0 y 6.5; y 20 mM de amortiguador de fosfato de sodio con pH 7.0. Todas estas formulaciones contenían 240 mM de trehalosa y 0.02% TWEEN 20®. Las formulaciones se almacenaron durante hasta 3 meses a temperaturas de -70°C, 5°C, 30°C, y 40°C y se determinó la estabilidad de la proteína mediante varias pruebas analíticas, incluidas CAC, pH, concentración, SEC e IEC. No se observaron cambios significativos en CAC, pH o concentración de proteína durante el almacenamiento de las muestras.

El análisis de las muestras por SEC mostró que no ocurrieron cambios significativos durante el almacenamiento a 5°C y -70°C. No obstante, la degradación observada como la formación de fragmentos de anticuerpo y agregados solubles ocurrió durante el almacenamiento a 30°C y 40°C (Fig. 20). Para comparar las formulaciones se monitoreó la cinética del monómero de anticuerpo durante el almacenamiento y se calcularon las constantes de tasa de primer orden. El perfil de la tasa de pH obtenida para la pérdida en monómero de anticuerpo se muestra en Fig. 21. La condición óptima para la estabilidad del monómero de anticuerpo se obtuvo formulando un amortiguador de acetato de histidina con pH 6.0.

La heterogeneidad de carga del Apomab se monitoreó por IEC. No ocurrieron cambios significativos en el perfil IEC durante el almacenamiento a 5°C y -70°C. No obstante, la degradación observada como la formación de variantes

115
118

ácidas o básicas ocurrió dependiendo de la formulación (Fig. 22). En general, se formaron variantes básicas incrementadas con un pH de formulación menor y variantes más ácidas se formaron con un pH de formulación más elevado. Para comparar las formulaciones, se monitoreó la cinética de pico principal IEC durante el almacenamiento y se calcularon las constantes de tasa de primer orden. El perfil de tasa de pH obtenido para la pérdida en el pico principal IEC se muestra en Fig. 23. Las constantes de tasa observadas por IEC fueron aproximadamente 10 veces más altas que las de SEC (Fig. 21). En consecuencia, la pérdida en pico principal IEC fue la degradación primaria del anticuerpo que finalmente limitará la vida útil del producto. Además, como se observó por SEC, la estabilidad de anticuerpo óptima para estabilizar el pico principal IEC se obtuvo formulando en amortiguador de acetato de histidina con pH 6.0.

Luego del análisis de los datos de cribado de pH ya descritos, se seleccionó una formulación de Apomab que comprendía 20 mg/mL de anticuerpo en 20 mM de acetato de histidina, 240 mM de trehalosa, 0.02% polisorbato 20, pH 6.0. Para el producto farmacéutico, la configuración de frasquito consistió de 5.5 mL de carga en un frasquito FORMA VITRUM™ de 5 cc con un tapón 20 mM DAIKYO™ West. El Apomab se almacenó en recipientes de acero inoxidable.

La estabilidad del Producto Farmacéutico Apomab se evaluó en la configuración de frasquito de vidrio de 5cc descrito anteriormente. Los frasquitos se almacenaron a -70°C (controles), 5°C, 30°C, y 40°C. Las muestras se extrajeron en intervalos de tiempo específicos y se analizaron mediante las siguientes pruebas: color, apariencia, claridad (CAC), pH, concentración de proteína, SEC, IEC, y potencia. Los resultados de estos análisis se muestran en la Tabla 6 para muestras almacenadas a -70°C y 5°C y la Tabla 7 para las muestras almacenadas a 30°C y 40°C.

Tabla 6. Datos de Estabilidad para Apomab Almacenado a -70°C y 5°C

Temperatura (°C)	Punto de Tiempo	Claridad	Color	pH	Concentración (mg/mL)	SEC (% Monómero)	IEC (% Pico Principal)	Potencia (% Actividad Específica)
<i>Criterios de</i>	<i>Aceptación:</i>	<i>Informe</i>	<i>Informe</i>	<i>6.0±0.3</i>	<i>20±2</i>	<i>≥ 95%</i>	<i>Informe</i>	<i>60 – 140%</i>
NA	T=0	Claro	Incoloro	5.9	20.2	99.8	63	94
-70	1 mes	Claro	Incoloro	6.0	20.5	99.8	63	86
-70	2 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.4	99.7	64	91
-70	3 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.5	99.7	63	83
-70	6 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.4	99.7	64	85
-70	9 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.4	99.8	65	89
-70	12	Claro	Incoloro	6.0	20.8	99.7	63	107
5	mes	Claro	Incoloro	6.0	20.5	99.7	63	89
5	1 mes	Claro	Incoloro	6.0	20.4	99.7	64	99
5	2 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.6	99.7	63	84

114
12/26

5	6 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.5	99.7	64	93
5	9 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.6	99.7	64	88
5	12 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.7	99.6	64	106

Tabla 7. Datos de Estabilidad para Apomab Almacenado a 30°C y 40°C

Temperatura (°C)	Punto de Tiempo	Claridad	Color	pH	Concentración (mg/mL)	SEC (% Monómero)	IEC (% Pico Principal)	Potencia (% Actividad Específica)
<i>Criterios de</i>	<i>Aceptación:</i>	<i>Informe</i>	<i>Informe</i>	<i>6.0±0.3</i>	<i>20±2</i>	<i>≥ 95%</i>	<i>Informe</i>	<i>60 – 140%</i>
30	1 mes	Claro	Incoloro	6.0	20.6	98.2	59	91
30	2 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.3	97.4	54	80
30	3 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.6	97.2	49	74
30	6 meses	Claro	Incoloro	6.0	20.2	94.1	37	51
30	9 meses	Claro	Ligeramente	6.0	20.4	93.2	31	55

120
163

30	12 meses	Claro	amarillo Ligeramente	6.0	20.6	91.6	25	59
40	1 meses	Claro	amarillo Incolora	6.0	20.4	96.6	44	79
40	2 meses	Claro	Incolora	6.0	20.0	93.7	31	64
40	3 meses	Claro	Ligeramente	5.9	20.3	91.5	22	53
40	6 meses	Claro	amarillo Ligeramente	6.0	20.2	83.9	NT	26
40	9 meses	Claro	amarillo Amarillo	5.9	20.3	78.8	NT	25
40	12 meses	Claro	Amarillo	5.9	20.5	71.4	NT	31

NT = no cuantificado

127

NT = no cuantificado

No se observó cambio en la calidad de proteína después de doce meses de almacenamiento a -70°C y 5°C . Por ejemplo, el pH permaneció a 6.0 ± 0.3 , el Apomab apareció como un líquido claro e incoloro, la concentración de proteína permaneció a $20.0 \pm 2.0 \text{ mg/mL}$, y el % de monómero no varió. Más aún, no hubo cambio significativo en el % pico principal IEC, y el % actividad específica determinada por el análisis de potencia de eliminación celular estuvo dentro de la precisión del análisis de 60 % a 140 % de actividad específica. Los resultados mostraron que el Apomab almacenado en frasquitos de 5 cc era estable durante por lo menos 12 meses a 5°C .

Tabla 7 muestra que ocurrieron cambios en la calidad de la proteína a 30°C y 40°C . La SEC mostró una disminución en el % de monómero con un aumento principalmente en la especie fragmento. Los agregados se incrementan también a temperatura más elevada, pero la tasa fue mucho más lenta. Sin embargo, los agregados aumentan significativamente después de 6 meses a 40°C . El pico principal % IEC disminuyó con un incremento correspondiente en las variantes ácidas. Los picos básicos disminuyeron ligeramente después de 2 meses a 40°C y 9 meses a 30°C . Luego de seis meses de almacenamiento a 40°C , ocurrió degradación en una medida en que el pico principal IEC ya no pudo integrarse. El bioanálisis de eliminación de células mostró pérdida de % de actividad específica a temperatura más elevada con un tiempo de almacenamiento más prolongado. La concentración de proteína y el pH permanecieron sin modificación. La solución se vuelve ligeramente amarilla después de 3 meses a 40°C y 9 meses a 30°C , y se torna amarilla después de 9 meses a 40°C .

Estabilidad de la Sustancia Farmacéutica

Los datos de estabilidad congelamiento-descongelamiento para la sustancia farmacéutica se muestran en la Tabla 8.

130

123

Tabla 8. Datos de Estabilidad Congelamiento-Descongelamiento para Apomab Envasado en Recipientes Miniatura de Acero Inoxidable

Temperatura (°C)	Ciclo Cong.- (Cong./Desc	Claridad	Color	pH	Concentración (mg/mL)	SEC (% Monómero)
<i>Criterios de</i>		<i>Informe</i>	<i>Informe</i>	<i>6.0±0.3</i>	<i>20.0±2.0</i>	<i>>95%</i>
Control (no congelado)	0	Clara	Incolora	6.0	20.9	99.6
-20/25	1	Clara	Incolora	6.0	20.8	99.6
-20/25	2	Clara	Incolora	6.0	20.8	99.6

Tabla 9. Datos de Estabilidad para Apomab Envasado en Recipientes Miniatura de Acero Inoxidable

Temperatura (°C)	Punto de Tiempo	Claridad	Color	pH	Concentración (mg/mL)	SEC (% Monómero)	IEC (% Pico Principal)	Potencia (% Actividad Específica)
<i>Criterios de</i>	<i>Aceptación:</i>	<i>Informe</i>	<i>Informe</i>	<i>6.0±0.3</i>	<i>20±2</i>	<i>≥ 95%</i>	<i>Informe</i>	<i>60 – 140%</i>
NA	T=0	Clara	Incolora	5.9	20.0	99.7	63	88
-20	1 meses	Clara	Incolora	6.0	20.6	99.7	63	107
-20	3 meses	Clara	Incolora	6.0	20.6	99.7	63	82
-20	6 meses	Clara	Incolora	6.0	20.3	99.7	64	92
-20	9 meses	Clara	Incolora	6.0	20.6	99.7	64	92
-20	12 meses	Clara	Incolora	6.0	21.2	99.7	65	94
5	1 meses	Clara	Incolora	6.0-	20.5	99.7	62	95
5	3 meses	Clara	Incolora	6.0	20.7	99.6	62	71
5	6 meses	Clara	Incolora	6.0	20.4	99.5	62	84
5	9 meses	Clara	Incolora	6.0	20.8	99.4	61	84
5	12 meses	Clara	Incolora	6.0	21.3	99.2	59	82

No se observaron cambios significativos en las características químicas de la proteína luego de congelarse a -20°C durante por lo menos 15 horas y descongelarse a temperatura ambiente tres veces. Por ejemplo, Apomab apareció como un líquido claro e incoloro, el pH permaneció en 6.0 ± 0.3, y el porcentaje de pico de monómero SEC no experimentó modificación.

La estabilidad del Apomab en recipientes de acero inoxidable se evaluó a - 20°C y 5°C (Tabla 9).

Las muestras se extrajeron asépticamente de los mini-recipientes en intervalos específicos y se analizaron.

Apomab no mostró cambio en la calidad de la proteína a 5°C ocasionado por pH, CAC, concentración de la proteína y pico principal % por IEC pero perdió 0.1% de monómero por SEC cada 3 meses. Se observó potencia disminuída durante el almacenamiento a 5°C durante 3 meses. Sin embargo, la potencia de la muestra se incrementó nuevamente en los puntos de tiempo 6 y 9 meses. Por lo tanto, la diferencia de potencia observada en el punto de tiempo 3 meses se atribuyó a la variación del análisis. Apomab no mostró cambio en la calidad de la proteína a - 20°C por pH, CAC, concentración de proteína, % de monómero por SEC, pico principal % por IEC, y ningún cambio significativo en potencia. Los datos de estabilidad muestran que Apomab es estable durante por lo menos 1 año a - 20°C y tres meses a 5°C.

CONCLUSIÓN

Se realizaron estudios de cribado de la formulación para seleccionar una formulación para Apomab. Un cribado de pH que cubría el rango de pH 4.0 a 7.0 usando acetato de sodio, acetato de histidina, y fosfato de sodio como amortiguadores con 240 mM de dihidrato de trehalosa y 0.02% polisorbato 20 mostró que Apomab es muy estable en solución a pH 6.0. En consecuencia, una formulación compuesta por 20 mM de acetato de histidina, 240 mM de trehalosa, 0.02% polisorbato 2, pH 6.0 se desarrolló y demostró en los experimentos que era estable. Usando esta formulación, Apomab demostró ser estable durante por lo menos 12 meses a 5°C. Más aún, Apomab demostró ser estable durante por lo menos 12 meses a - 20°C y tres meses a 5°C cuando se almacenó en recipientes de acero inoxidable 316L. Además Apomab demostró ser estable cuando se sometió hasta a 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica estable que comprende un anticuerpo monoclonal en un amortiguador de acetato de histidina, pH 5.5 a 6.5.
2. La formulación de la reivindicación 1 en donde el pH es desde 5.8 a 6.2.
3. La formulación de la reivindicación 1 en donde la concentración del amortiguador de acetato de histidina es desde alrededor de 1mM a alrededor de 200mM.
4. La formulación de la reivindicación 3 en donde la concentración del amortiguador de acetato de histidina es desde alrededor de 10mM a alrededor de 40mM.
5. La formulación de la reivindicación 1 en donde la concentración de anticuerpo es desde alrededor de 10mg/mL a alrededor de 250mg/mL.
6. La formulación de la reivindicación 5 en donde la concentración del anticuerpo monoclonal es desde alrededor de 20mg/mL a alrededor de 40mg/mL.
7. La formulación de la reivindicación 5 en donde la concentración del anticuerpo monoclonal es desde alrededor de 80mg/mL a alrededor de 250mg/mL.
8. La formulación de la reivindicación 1 que comprende además un sacárido.
9. La formulación de la reivindicación 8 en donde el sacárido es un disacárido.
10. La formulación de la reivindicación 8 en donde el sacárido es trehalosa.
11. La formulación de la reivindicación 8 en donde el sacárido es sacarosa.
12. La formulación de la reivindicación 8 en donde la concentración de sacárido es desde alrededor de 10mM a alrededor de 1M.

13. La formulación de la reivindicación 12 en donde la concentración de sacárido es desde alrededor de 60mM a alrededor de 250mM.
14. La formulación de la reivindicación 1 que comprende además un surfactante.
15. La formulación de la reivindicación 14 en donde el surfactante es polisorbato.
16. La formulación de la reivindicación 15 en donde el surfactante es polisorbato 20.
17. La formulación de la reivindicación 14 en donde la concentración de surfactante es desde alrededor de 0.0001% a alrededor de 1.0%.
18. La formulación de la reivindicación 17 en donde la concentración de surfactante es desde alrededor de 0.01% a alrededor de 0.1%.
19. La formulación de la reivindicación 1 en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de longitud total.
20. La formulación de la reivindicación 19 en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgG1.
21. La formulación de la reivindicación 1 en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.
22. La formulación de la reivindicación 1 en donde el anticuerpo monoclonal es un fragmento de anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno.
23. La formulación de la reivindicación 22 en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab o F(ab')₂.
24. La formulación de la reivindicación 1 que es estéril.

25. La formulación de la reivindicación 1 en donde el anticuerpo monoclonal une un antígeno seleccionado del grupo conformado por HER2, CD20, DR5, BR3, IgE, y VEGF.
26. La formulación de la reivindicación 25 en donde el antígeno es CD20 y el anticuerpo monoclonal es 2H7 humanizado.
27. La formulación de la reivindicación 25 en donde el antígeno es VEGF y el anticuerpo monoclonal es Bevacizumab.
28. La formulación de la reivindicación 1 en donde el anticuerpo monoclonal es susceptible a desamidación o agregación.
29. La formulación de la reivindicación 1 que es estable luego del almacenamiento a alrededor de 40°C durante por lo menos 4 semanas.
30. La formulación de la reivindicación 1 que es estable luego del almacenamiento a alrededor de 5°C o alrededor de 15°C durante por lo menos 3 meses.
31. La formulación de la reivindicación 1 que es estable luego del almacenamiento a alrededor de -20°C durante por lo menos 3 meses.
32. La formulación de la reivindicación 1 que es estable luego del congelamiento y descongelamiento.
33. La formulación de la reivindicación 1 que es acuosa.
34. La formulación de la reivindicación 1 que es congelada.
35. La formulación de la reivindicación 1 que no es liofilizada y no se ha sometido a liofilización previa.
36. La formulación de la reivindicación 35 que es acuosa y se administra a un sujeto.

128
129

37. La formulación de la reivindicación 36 en donde la formulación es para administración intravenosa (IV), subcutánea (SQ) o intramuscular (IM).
38. La formulación de la reivindicación 37 que es para administración IV y la concentración de anticuerpo es desde alrededor de 20mg/mL a alrededor de 40mg/mL.
39. La formulación de la reivindicación 37 que es para administración SQ y la concentración de anticuerpo es desde alrededor de 80mg/mL a alrededor de 250mg/mL.
40. Un frasquito con un tapón perforable por una jeringa, que comprende la formulación de la reivindicación 1 dentro del frasquito.
41. El frasquito de la reivindicación 40 el cual se almacena a alrededor de 2-8°C.
42. El frasquito de la reivindicación 40 el cual es un frasquito de 20cc o 50cc.
43. Un recipiente de acero inoxidable que comprende la formulación de la reivindicación 1 dentro del recipiente.
44. El recipiente de la reivindicación 43 en donde la formulación contenida en él se congela.
45. Un método de tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que comprende administrar la formulación de la reivindicación 1 a un sujeto en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad o trastorno.
46. Una formulación farmacéutica que comprende:
- (a) un anticuerpo IgG1 de longitud total, susceptible a desamidación o agregación en una cantidad desde alrededor de 10mg/mL a alrededor de 250mg/mL;
- (b) un amortiguador de acetato de histidina, pH 5.5 a 6.5;

(c) un sacárido seleccionado del grupo conformado por trehalosa y sacarosa, en una cantidad desde alrededor de 60mM a alrededor de 250mM; y

(d) polisorbato 20 en una cantidad desde alrededor de 0.01% a alrededor de 0.1%.

47. Un método para reducir la desamidación o agregación de un anticuerpo monoclonal terapéutico, que comprende formular el anticuerpo en un amortiguador de acetato de histidina, pH 5.5 a 6.5.

48. El método de la reivindicación 47 que comprende evaluar cualquier desamidación o agregación de anticuerpo antes y después de que se formule el anticuerpo.

49. Una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une al dominio II de HER2 en un amortiguador de histidina con un pH desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5, un sacárido, y un surfactante.

50. La formulación de la reivindicación 49 en donde el amortiguador es acetato de histidina.

51. La formulación de la reivindicación 49 en donde el anticuerpo HER2 comprende las secuencias de aminoácidos pesadas variables y ligeras variables en SEQ ID Nos. 3 y 4, respectivamente.

52. La formulación de la reivindicación 51 en donde el anticuerpo HER2 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera, seleccionada de SEQ ID No. 15 y 23, y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada, seleccionada de SEQ ID Nos. 16 y 24.

53. La formulación de la reivindicación 49 en donde el pH de la formulación es desde alrededor de 5.8 a alrededor de 6.2.

54. La formulación de la reivindicación 49 en donde el anticuerpo se une al empalme entre los dominios I, II y III de HER2.

55. La formulación de la reivindicación 49 en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud total.

56. La formulación de la reivindicación 49 en donde la concentración de anticuerpo es desde alrededor de 20mg/mL a alrededor de 40mg/mL.

57. Una formulación farmacéutica que comprende Pertuzumab en una cantidad desde alrededor de 20mg/mL a alrededor de 40mg/mL, amortiguador de acetato de histidina, sacarosa, y polisorbato 20, en donde el pH de la formulación es desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5.

58. La formulación de la reivindicación 57 que comprende alrededor de 30mg/mL Pertuzumab, alrededor de 20mM de acetato de histidina, alrededor de 120mM sacarosa, y alrededor de 0.02% polisorbato 20, en donde el pH de la formulación es alrededor de 6.0.

59. Un frasquito con un tapón perforable por una jeringa, el cual comprende la formulación de la reivindicación 49.

60. Un recipiente de acero inoxidable que comprende la formulación de la reivindicación 49 en el recipiente.

61. Un método de tratar cáncer que expresa HER2 en un sujeto, que comprende administrar la formulación farmacéutica de la reivindicación 49 al sujeto en una cantidad efectiva para tratar el cáncer.

62. El método de la reivindicación 61 en donde la formulación se administra al sujeto por vía intravenosa, subcutánea, o intramuscular.

63. Un método de elaborar una formulación farmacéutica que comprende:

(a) preparar la formulación de la reivindicación 1; y

(b) evaluar la estabilidad física, la estabilidad química, o actividad biológica del anticuerpo monoclonal en la formulación.

64. Una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo DR5 en un amortiguador de histidina con un pH desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5, un sacárido, y un surfactante.
65. La formulación de la reivindicación 64 en donde el amortiguador es acetato de histidina.
66. La formulación de la reivindicación 64 en donde el anticuerpo DR5 es un anticuerpo agonista.
67. La formulación de la reivindicación 64 en donde el anticuerpo DR5 es Apomab.
68. La formulación de la reivindicación 67 en donde el anticuerpo DR5 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID No. 51, y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID No. 52.
69. La formulación de la reivindicación 64 en donde el pH de la formulación es desde alrededor de 5.8 a alrededor de 6.2.
70. La formulación de la reivindicación 64 en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud total.
71. La formulación de la reivindicación 64 en donde la concentración de anticuerpo es desde alrededor de 10mg/mL a alrededor de 30mg/mL.
72. Una formulación farmacéutica que comprende Apomab en una cantidad desde alrededor de 10mg/mL a alrededor de 30mg/mL, amortiguador de acetato de histidina, trehalosa, y polisorbato 20, en donde el pH de la formulación es desde alrededor de 5.5 a alrededor de 6.5.
73. La formulación de la reivindicación 72 que comprende alrededor de 20mg/mL Apomab, alrededor de 20mM de acetato de histidina, alrededor de 240mM de trehalosa, y alrededor de 0.02% polisorbato 20, en donde el pH de la formulación es alrededor de 6.0.

74. Un frasquito con un tapón perforable por una jeringa, el cual comprende la formulación de la reivindicación 64.

75. Un recipiente de acero inoxidable que comprende la formulación de la reivindicación 64 en el recipiente.

76. Un método de tratar cáncer en un sujeto, que comprende administrar la formulación farmacéutica de la reivindicación 64 al sujeto en una cantidad efectiva para tratar cáncer.

77. El método de la reivindicación 76 en donde el cáncer es un tumor sólido.

78. El método de la reivindicación 76 en donde el cáncer es linfoma no hodgkiniano.

79. El método de la reivindicación 76 en donde la formulación se administra al sujeto por vía intravenosa, subcutánea, o intramuscular.

133
TH

Brigard & Castro
BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y 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 desistirse 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 desistirse, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990 USA**

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

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

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

South San Francisco, California

Granted and signed in **USA**

this 6th day of December 2005

Signature

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

AUTHORIZATION

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

August 27, 2002

Dated

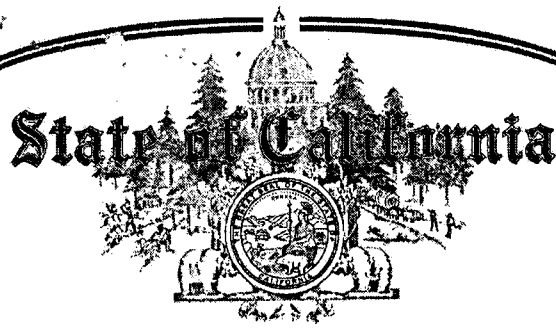
Sean Johnston

Sean A. Johnston

Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.

134

10:77:00



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

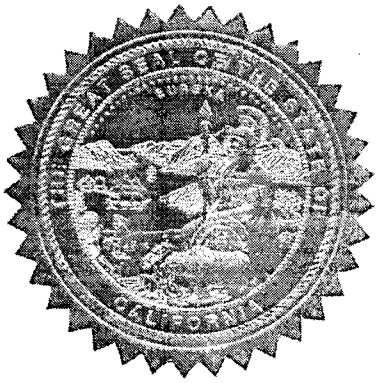
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

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

10. Signature



Bruce McChesney

Secretary of State

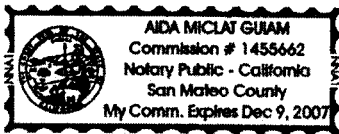
[Signature]

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

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

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

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



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

OPTIONAL

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

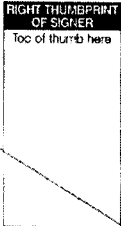
Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____
Document Date: _____ Number of Pages: _____
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

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

Signer Is Representing: _____



Q3 33

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

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

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

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

CERTIFICADO

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

10. Firma

(Firma)
Secretario de Estado

RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

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

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

☐ a quien conozco personalmente

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

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

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

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

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

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

Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

- ☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de hecho
☐ Fideicomisario
☐ Guardián o conservador
☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

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.

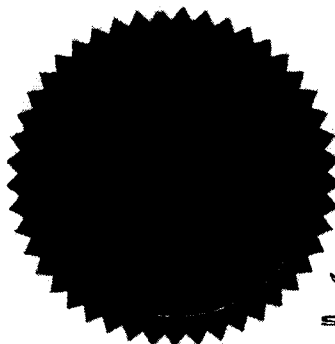
Apostille

(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

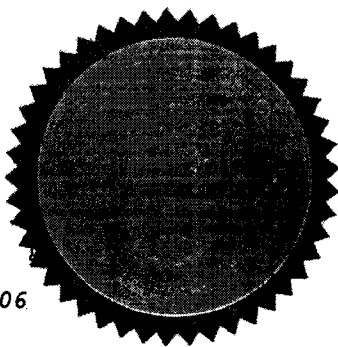
137
144

Delaware

PAGE 1

The First State

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



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

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

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

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

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

ARTICLE 3

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

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, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

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

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

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

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

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

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

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

TH

ARTICLE 5

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

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

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

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

ARTICLE 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARTICLE 7

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

ARTICLE 8

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

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

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

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

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

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty 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.

147 148

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

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

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

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

ARTICLE 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

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

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

APOSTILLA

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

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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

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

FECHA: 05 – 24 – 05

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

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

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

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

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

ARTICULO 3

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

ARTICULO 4

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

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

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

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

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

SECCIÓN 4.03. Acción Preferencial

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

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

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, 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, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

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

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

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

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

ARTICULO 5

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

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

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por 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.

o

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

ARTICULO 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARTICULO 7

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

147 154

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 artículo 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

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

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

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

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

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

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

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo 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 propósitos 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 con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliados**" (como se

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

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

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

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo 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 o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

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

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

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo 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 cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General 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

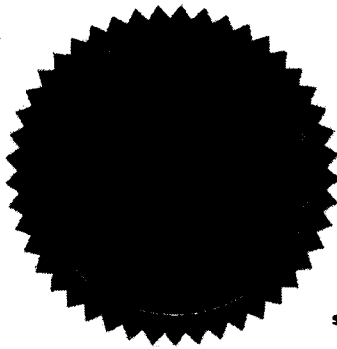
5. at Dover, Delaware

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

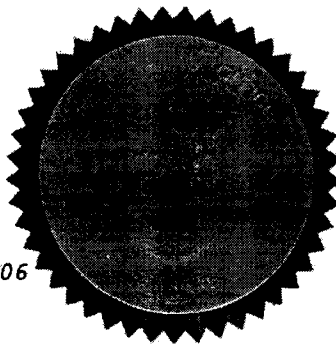
150 *[initials]*

Delaware

PAGE 1

The First State

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



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

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."

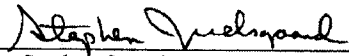
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares 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: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

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

APOSTILLA

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

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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

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

FECHA: 05 - 24 - 05

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**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

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

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

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

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

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

3/4

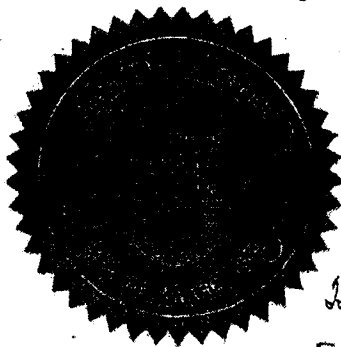
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254033
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



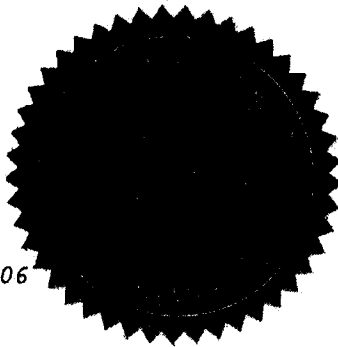
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

Delaware

PAGE 1

The First State

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



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

754 161

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV.040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

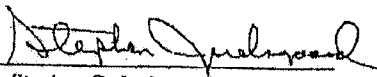
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares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

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

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

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

GENENTECH, INC.

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

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

APOSTILLA

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

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

Certificado +

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

155
169

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.

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.

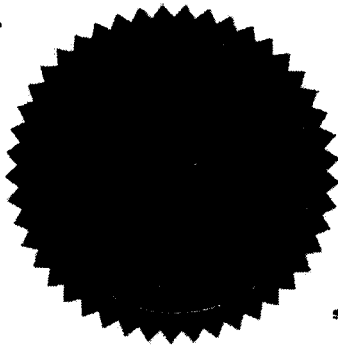
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254032
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



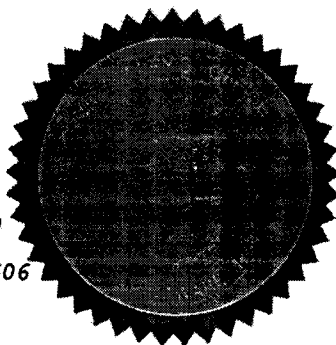
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

Delaware

PAGE 1

The First State

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



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

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

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By:

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

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

APOSTILLA

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

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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

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

FECHA: 05 - 24 - 05

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

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

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

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

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

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.

160
167

As. 103411
(12)

**DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION**

ASSIGNMENT

The Undersigned James D. ANDYA, Ye SHEN

acting as Inventors

of Colombian Patent Appln. No. 07 038.013
Title: ANTIBODY FORMULATION IN
HISTIDINE-ACETATE BUFFER

with domicile in 227 Richmond Drive, Apt. D,
Millbrae, CA 94030, United States of America;
386 Faxon Avenue, San Francisco, CA
94112, United States of America
(respectively)

hereby declare(s) that he (they) assign(s) all
rights of ownership as well as all rights and
privileges relating thereto without exception
over the following patent application in
Colombia:

No. 07 038.013
Title: ANTIBODY FORMULATION IN
HISTIDINE-ACETATE BUFFER

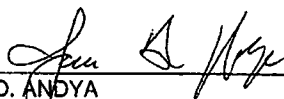
to: GENENTECH, INC.

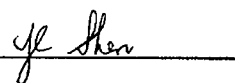
domiciled in 1 DNA Way, South San
Francisco, CA 94080-4990, United States of
America

The assignor and the assignee sign this
document as proof of their acceptance of the
assignment.

Given and signed on the day of
of 200_

Signature of Assignor(s)


James D. ANDYA


Ye SHEN

Signature of Assignee

 EMB

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Associate General Counsel, Director
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

**DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE**

CESION

El(los) Suscrito(s) James D. ANDYA, Ye SHEN

en calidad de Inventores

de la Sol. de patente Colombiana No. 07 038.013
Titulada: FORMULACIÓN DE ANTICUERPO
EN AMORTIGUADOR DE ACETATO DE
HISTIDINA

con domicilio en 227 Richmond Drive, Apt. D,
Millbrae, CA 94030, Estados Unidos de
América; 386 Faxon Avenue, San Francisco,
CA 94112, Estados Unidos de América
(respectivamente)

declara(n) por el presente documento que
cede(n) todos los derechos de propiedad que
le(s) correspondan, así como las prerrogativas,
sin excepción alguna, sobre la siguiente
solicitud de patente en Colombia:

No. 07 038.013
Titulada: FORMULACIÓN DE ANTICUERPO
EN AMORTIGUADOR DE ACETATO DE
HISTIDINA

a: GENENTECH, INC.

domiciliada en in 1 DNA Way, South San
Francisco, CA 94080-4990, Estados Unidos
de América

El cedente y el cesionario firman este
documento como prueba de su aceptación de
la cesión.

Dado y firmado a los días del mes de
de 200_

Firma del Cedente

Firma del Cesionario

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 CAROLYN C. CAIRES
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of CAROLYN C. CAIRES, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 16th day of May 2007
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 391153
9. Seal/Stamp:



10. Signature

John Bowen
Secretary of State



167
169

ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo

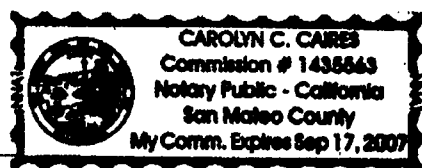
On 1 May 2007 before me, Carolyn C. Caires, Notary Public
(here insert name and title of the officer)

personally appeared James D. Andya and Ye Shen

personally known to me ~~(or 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.

Signature *Carolyn C. Caires*
Carolyn C. Caires



(Seal)

DATE

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 CAROLYN C. CAIRES*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of CAROLYN C. CAIRES, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 16th day of May 2007*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 391154*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature



John Bowen
Secretary of State



ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo

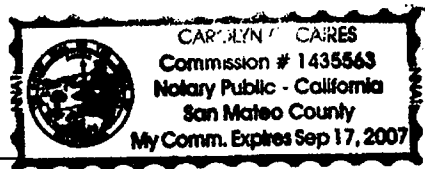
On 7 May 2007 before me, Carolyn C. Caires, Notary Public,
(here insert name and title of the officer)

personally appeared Timothy R. Schwartz

personally known to me ~~(or 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.

Signature Carolyn C. Caires
Carolyn C. Caires



(Seal)

CAPACITY(IES) CLAIMED BY SIGNER

Signer's Name: Timothy R. Schwartz
Corporate Officer - Title(s): Associate General Counsel - Director
Signer is representing: GENENTECH, INC.

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Cesión a **GENENTECH, INC.**
firmada por el cedente y el cesionario.

Hay un sello que dice:

Timothy R. Schwartz, Ph.D
Consejero General Asociado
Genentech, Inc.
Firmante Corporativo Autorizado

ESTADO DE CALIFORNIA
[Sello]

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre 1961)

- 1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
- 2. ha sido firmado por Carolyn C. Caires
- 3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
- 4. lleva el sello/timbre de Carolyn C. Caires, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

- 5. En Sacramento, California
- 6. el 16o día de Mayo de 2007
- 7. por el Secretario de Estado Encargado, Estado de California
- 8. No. 391153
- 9. Sello/Timbre

Hay un sello que dice:

10. Firma

EL GRAN SELLO DE
EL ESTADO DE CALIFORNIA

(firma)
Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO

Estado de California

Condado de San Mateo

El 1ro de Mayo de 2007 ante mi, Carolyn Caires, Notario Público, se
presentaron personalmente James D. Andya y Ye Shen

personalmente conocidos por mi como la(s) persona(s) cuyo(s) nombre(s) están
suscritos al presente instrumento y quienes reconocieron que ellos ejecutaron la
misma en su capacidad autorizada, y que por su(s) firma(s) en el instrumento la
persona(s) o la entidad de parte de la cual la persona(s) actuó ejecutó el
instrumento.

EN TESTIMONIO mi firma y sello oficial.

Firma _____ (firma)
Carolyn C. Caires

Hay un sello que dice:
CAROLYN C. CAIRES
Comisión # 1435563
Notario Público – California
Condado de San Mateo
Mi Comisión Vence Sep. 17, 2007

ESTADO DE CALIFORNIA

[Sello]

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Carolyn C. Caires
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de Carolyn C. Caires, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

5. En Sacramento, California
6. el 16o día de Mayo de 2007
7. por el Secretario de Estado Encargado, Estado de California
8. No. 391154
9. Sello/Timbre

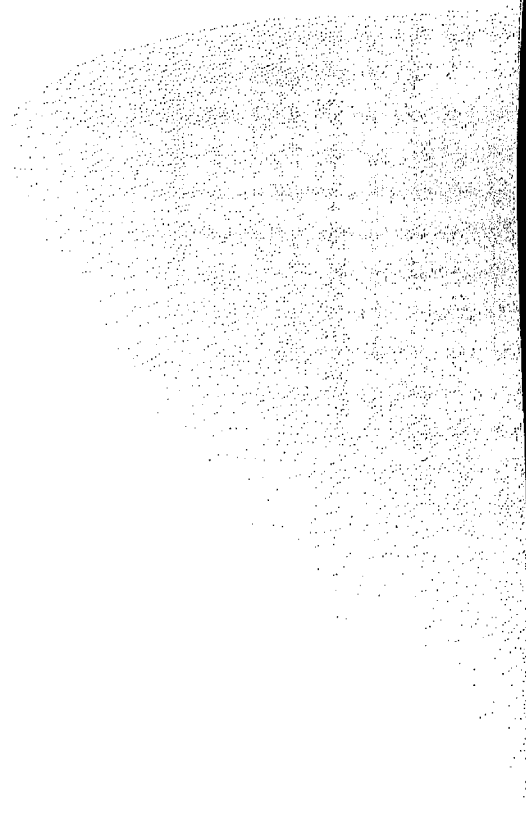
Hay un sello que dice:

10. Firma

EL GRAN SELLO DE
EL ESTADO DE CALIFORNIA

(firma)
Secretario de Estado





RECONOCIMIENTO

Estado de California

Condado de San Mateo

El 7 de Mayo de 2007 ante mí, Carolyn Caires, Notario Público, se presentó personalmente Timothy R. Schwartz

personalmente conocidos por mí como la(s) persona(s) cuyo(s) nombre(s) está suscrito al presente instrumento y quien reconoció que el ejecutó la misma en su capacidad autorizada, y que por su(s) firma(s) en el instrumento la persona(s) o la entidad de parte de la cual la persona(s) actuó ejecutó el instrumento.

EN TESTIMONIO mi firma y sello oficial.

Firma _____ (firma)
Carolyn C. Caires

Hay un sello que dice:
CAROLYN C. CAIRES
Comisión # 1435563
Notario Público – California
Condado de San Mateo
Mi Comisión Vence Sep. 17, 2007

CAPACIDAD(ES) AFIRMADAS POR EL FIRMANTE

Nombre del Firmante: Timothy R. Schwartz
Funcionario Corporativo – Título: Consejero General Asociado – Director
El firmante representa a: 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 M. K. Carter

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the twenty-third of May, 2007

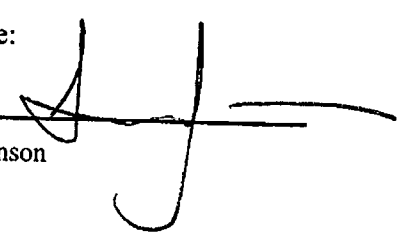
7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 07023812-11

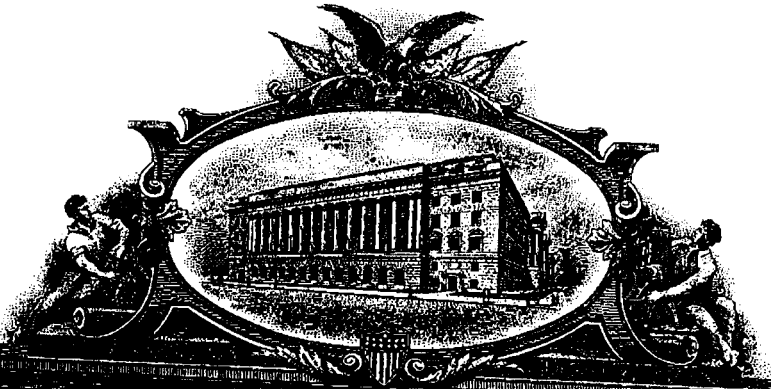
9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Sonya N. Johnson



A 7065252



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

May 01, 2007

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
JANUARY 03, 2005.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office




M. K. CARTER
Certifying Officer

166
173

5 10:17 FROM:DNA/NEWLINE 540-825-5751

TO:17033065995

P:2/5

**RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY**

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office

Assistant Commissioner of Patents: Please record the attached original documents or copy thereof.

Atty Dkt No: PR2104

1. Name of conveying party(ies):

Shiang C. Gwee
Jun Liu

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: GENENTECH, INC.

Internal Address:

Street Address: 1 DNA Way

City: South San Francisco State: California

ZIP: 94080-4990

Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

☒ Assignment

Merger

Security Agreement

Change of Name

Other:

Execution Date: 12/16/04 & 12/17/04

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s)

B. Patent No.(s)

60620,413

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Wendy M. Lee
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

6. Total number of applications and patents involved: 1

7. Total fee (37 CFR 3.41): \$ 40.00

☐ Enclosed

☒ Authorized to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

07-0630

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Wendy M. Lee
Name of Person Signing
Registration No. 40,378

Wm Lee
Signature

1-3-05
Date

Total number of pages comprising cover sheet, attachments and document: 4

Revised (10/1/95)

CH \$40.00 070630 60620413

#170458

700142192

PATENT
REEL: 015516 FRAME: 0148

ASSIGNMENT
(joint provisional appln.)

WHEREAS, Shiang C. Gwee, a citizen of the U.S.A., residing at 565 Crespi Drive, Pacifica, CA 94044, and Jun Liu, a citizen of the U.S.A., residing at 1108 Glacier Avenue, Pacifica, CA 94044, (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

ANTIBODY FORMULATIONS

in which a provisional application Serial No. 60/620,413 has been filed by them on October 20, 2004;

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4490, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

PATENT
REEL: 015516 FRAME: 0149

10:17 FROM:DNA/NEWLINE 540-825-5751

TO:17033065995

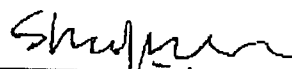
P:4/5

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows:

San Francisco

12/16/2004



Name: Shiang C. Gwee

San Francisco

Name: Jun Liu

PATENT

REEL: 015516 FRAME: 0150

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Cesión a **GENENTECH, INC.** firmado por los cedentes y el cesionario.

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 M. K Carter
3. actuando en capacidad de Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/timbre de la Oficina de marcas y patentes

Certificado

5. en Washington D.C.
6. el veintitrés de Mayo de 2007
7. por el Funcionario de autenticación asistente, Departamento de Estado de Estados Unidos
8. No. 07023812-11
9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Sonya N. Johnson

[sello]

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGARLE LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos

Mayo 1 de 2007

ESTE ES PARA CERTIFICAR QUE EL ANEXO ES UNA COPIA
VERDADERA DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN
DOCUMENTO ARCHIVADO EL 3 DE ENERO DE 2005.

Por autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patente de Estados Unidos

M. K. CARTER
Funcionario que Certifica

HOJA DE PORTADA DEL FORMULARIO DE REGISTRO SOLAMENTE PATENTES		Departamento de Comercio Oficina de Marcas y Patentes Expediente de abogado No. PR2179
Comisionado Asistente para patentes: Por favor archive los documentos originales anexos o copias de los mismos		
1. Nombre de la(s) parte(s) cedente(s): Shiang C. Gwee Jun Liu ¿Se anexa(n) nombre(s) adicional(es) de parte(s) cedente(s)? _ Si ☒ No	2. Nombre y dirección de la(s) parte(s) receptora(s) Nombre: <u>GENENTECH, INC.</u> Dirección interna: Dirección: <u>1 DNA Way</u> Ciudad: <u>South San Francisco</u> Estado: <u>California</u> ZIP: <u>94080-4990</u> ¿Se anexan Nombre(s) y dirección(es) adicional(es)? _ Si ☒ No	
3. Naturaleza del traspaso: ☒ Cesión Fusión Acuerdo de Seguridad Cambio de Nombre Otro: Fecha de Ejecución: <u>12/16/04 & 12/17/04</u>		
4. Numero(s) de solicitud o número(s) de patente: Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es: A. Solicitud de patente No(s). B. Patente No(s). <u>60/620,413</u> ¿Se anexa números adicionales? _ Si ☒ No		
5. Nombre y dirección de la parte a quien se le debe enviar la correspondencia: Wendy M. Lee GENENTECH, INC. 1DNA Way South San Francisco, CA 94080		6. Numero total de solicitudes y patentes involucradas: <u>1</u> 7. Tarifa total (37 C.F.R 3.41): <u>\$40.00</u> ☐ Adjunta ☒ Autorizado para cargarla a cuenta de depósito 8. Número de cuenta de Depósito: <u>07-0630</u>
NO USE ESTE ESPACIO		
9. Declaración y firma. hasta donde se y creo, la información anterior es verdadera y correcta y cualquier copia anexa es una copia verdadera del documento original. <u>Wendy M. Lee</u> (Firma) <u>1-3-05</u> Nombre de la persona que firma Firma Fecha <u>Registro No. 40,378</u> Número total de páginas que comprenden portada, anexos y documento: 5		

700142192

PATENTE
ROLLO: 015516 CUADRO 0148

769
176

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, Shiang C. Gwee, un ciudadano de E.U.A., residente en 565 Crespi Drive, Pacifica, CA, 94044, y Jun Liu, un ciudadano de E.U.A., residente en 1108 Glacier Avenue, Pacifica, CA 94044 (en adelante referidos como "CEDENTE"), han inventado una invención nueva y útil

FORMULACIONES DE ANTICUERPOS

para la cual se presentaron la solicitud provisional con No. de Serie 60/620,413 el **20 de octubre de 2004**; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dicho CEDENTE ha y por la presente vende, cede, transfiere y traspasa a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dicho CEDENTE garantiza y acuerda cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., a disfrutar hasta su máxima extensión el derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTE incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dicho CEDENTE al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben lastimar a beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTE, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

PATENTE
ROLLO: 015516 CUADRO 0149

Dicho CEDENTE por la presente garantiza y manifiesta que no ha entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL suscribimos como sigue:

South San Francisco (Firma)
Shiang C. Gwee

Fecha: 12/16/04

South San Francisco
Jun Liu

Fecha: _____

PATENTE
ROLLO: 015516 CUADRO 0150

770 ~~777~~

South San Francisco

Fechado:_____

South San Francisco

Jun Liu (firma)

Fechado: 12/17/04

PATENTE
ROLLO: 015516 CUADRO 0151