



As. 103.276

Señor

**DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

E.

S.

D.

REF: Expediente No. **07 21228**– solicitud de patente de invención a favor de **GENENTECH, INC. y NOVARTIS, AG**. Título **PROCESOS PARA LA CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS Y PRODUCTOS TERAPEUTICOS DE LOS MISMOS**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al oficio número 09971 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 8 de Junio de 2012.

Con el ánimo de subsanar las objeciones planteadas por el señor Examinador, nos permitimos presentar un nuevo pliego reivindicatorio compuesto por 51 reivindicaciones, en donde no se amplía en ningún momento la materia inicialmente divulgada, y se encuentra enteramente sustentado en la descripción.

Nos permitimos poner en conocimiento del señor examinador que el pliego reivindicatorio fue modificado de tal manera que se refiera a “preparaciones de anticuerpos” en lugar de “preparación de proteínas”. Sin embargo queremos dejar en claro que no nos encontramos de acuerdo con la objeción emitida por su Despacho ya que la presente invención puede estar dirigida a proteínas en general, basados en las amplias enseñanzas de la descripción que permiten al versado en la materia extrapolar el proceso reivindicado no solamente a proteínas tipo anticuerpos.

Por otra parte, expresamos nuestro total desacuerdo respecto a la afirmación emitida por el señor Examinador, mediante la cual asegura que el proceso debe estar caracterizado por la totalidad de sus condiciones, debiéndose indicar valores exactos de temperatura, pH, tamaños de poro, composición de buffer, entre otras. Al respecto nos permitimos indicar al señor Examinador que dentro de la descripción se da un número suficiente de ejemplos, los cuales permiten ilustrar las mejores formas de llevar a cabo la invención, y en de los que se muestra que la misma puede ser llevada a cabo bajo una amplia serie de condiciones, que de ninguna manera limitan el alcance del proceso reivindicado. Así, el pliego reivindicatorio revela la materia a proteger contemplando los parámetros esenciales del proceso pero conservando el derecho que tiene el solicitante de proteger dicho proceso contra el potencial fraude por parte de terceros, que por medio de modificaciones simples intentarían infringir la protección eventualmente obtenida para la presente invención.

Respetuosamente referimos al señor Examinador a las enseñanzas y a los doce (12) ejemplos presentados a lo largo de la descripción, en donde se establecen las condiciones de diferentes realizaciones o modalidades del proceso. De esta forma indudablemente encontrara el sustento que se requiere para la comprensión total de la invención.

Así, es absolutamente claro que las reivindicaciones encuentran entero soporte en la respectiva descripción, y que por medio de la combinación de la información contenida en éstas, el normalmente versado en la materia puede encontrar las bases y las características requeridas que le permitirían llevar a cabo el proceso que se propone en la presente solicitud.

Ahora bien, reiteramos que las reivindicaciones se encuentran enteramente sustentadas por la totalidad de las enseñanzas de descripción y que los ejemplos brindados en la misma no pueden considerarse limitantes de la materia reivindicada. Nos permitimos respetuosamente recordar al señor Examinador que el artículo 30 de la Decisión 486 establece que las reivindicaciones deben estar sustentadas en la descripción **no en los ejemplos** ya que estos son únicamente ilustrativos de la materia reivindicada.

Sin embargo, queremos referir al señor Examinador a los ejemplos 5 y 6 de la descripción en donde se ilustran los rangos de temperatura y los rangos de concentración de proteína contenidos en las reivindicaciones, así el ejemplo 5 establece:

"Para comenzar la etapa, el combinado proteico se transfirió al recipiente de recirculación (...) en el recipiente, el combinado se agitó mediante un impulsor de montaje superior y la temperatura se mantuvo a aproximadamente (40-50 °C). "

"Durante la diafiltración se mantuvo la temperatura entre 40° y 50 °C"
Rangos de temperatura que evidentemente corresponden con los estipulados en el pliego reivindicatorio,

"El proceso de cualquiera de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque una o más de las etapas a), b) y c) son llevadas a cabo a una temperatura de 40°C a 50°C."

Por otro lado, el mismo ejemplo 5 establece

"Al término de la diafiltración, el combinado se concentró adicionalmente en el modo de la UF2 a un punto fijo de concentración final mayor que 170 g de E25/L."

Lo cual ilustra perfectamente lo establecido en el pliego reivindicatorio, por ejemplo, con la reivindicación 12,

"El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de anticuerpo tiene una concentración de proteína de 100 a 230 gramos por litro."

Así, reiteramos que la descripción contiene toda la información que se requiere para llevar a cabo el presente proceso, mostrando adicionalmente ejemplos que permiten **ilustrar** y **no limitar** las mejores formas de realizar la invención.

Por otra parte, observamos que el señor Examinador establece lo siguiente: "El rendimiento de la tercera preparación de proteínas, definido en la reivindicación 18, es más amplio que el valor definido en la reivindicación de cual depende. Se sugiere verificar la dependencia de tales reivindicaciones."

Al respecto expresamos nuevamente nuestro desacuerdo con el señor Examinador. En primera medida cabe recordar que como fin de cualquier proceso de separación se encuentra la obtención del mayor rendimiento posible, por tal razón, el alcance de la

anterior reivindicación 17 ha sido establecido de manera tal que se establezca un valor *superior a 70%* de rendimiento en peso. Ahora bien, la reivindicación establece que el rendimiento de la tercera preparación es de *80% en peso a 100% en peso*, es decir, que reivindica valores superiores a 70%. Por tanto es evidente que *80% en peso a 100% en peso* se encuentra dentro del alcance de *superior a 70%*, motivo por el cual es un error sugerir modificar la dependencia de las reivindicaciones implicadas.

Ahora bien, el señor Examinador alega claridad en lo referente al origen de la biocarga obtenida en el presente proceso. Consideramos que el término "biocarga" es absolutamente claro para el versado en la materia y por tanto es evidente el origen de la misma. Con el fin de brindar la claridad solicitada al señor Examinador, nos permitimos recordar lo siguiente,

"Biocarga (o carga microbiana) es el número y tipo de microorganismos viables presentes en un elemento determinado"

Por tanto, al tener presente el concepto, el claro que el término en el contexto de la presente invención se refiere a los contaminantes microbiológicos en la preparación, al recordar que se está trabajando con materiales biológicos que son naturalmente propensos a la contaminación de éste tipo.

Para mayor claridad, en caso de requerirse, en el nuevo pliego reivindicatorio se ha modificado la primera mención de la unidad de medida UFC/ml, aclarando que UFC corresponde a Unidades Formadoras de Colonia.

El señor Examinador adicionalmente ha emitido una objeción asegurando que los valores de UFC/ml no son consistentes con la descripción, al respecto, nos permitimos referir al señor examinador a la descripción, en donde se establece,

Ejemplo 3

"Justo antes de la recuperación del producto, una muestra de 10 mL se analizó para detección y tipificación de biocarga. Un límite de rechazo típico es 1.000 de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Los resultados de esta evaluación fueron 1,8 de UFC/mL, un valor adecuado en este paso y bien por debajo del límite de rechazo."

Ejemplo 5

"Justo antes de la recuperación del producto, se tomó una muestra de 30 mL y se entregó para detección y tipificación de biocarga. El resultado fue de <0,13 de UFC/mL."

Ejemplo 6

"Justo antes de la recuperación del producto, se tomó una muestra de 30 mL y se analizó para la tipificación de biocarga. Los resultados de esta prueba fueron inferiores al límite de detección (< 0,13 de UFC/mL)."

Solicitamos amablemente al señor Examinador que antes de realizar las objeciones pertinentes realice una lectura detallada de la descripción, pues, como es evidente, toda la información solicitada por su despacho se encontraba reflejada en la presente descripción.

En conclusión, consideramos que el alcance de las nuevas reivindicaciones se encuentra debidamente sustentado en la totalidad de las enseñanzas de la descripción y más aun teniendo en cuenta que los ejemplos son plenamente ilustrativos de la invención pero de ninguna manera se deben considerar como limitativos de la materia reivindicada, por la cual solicitamos respetuosamente aceptar el nuevo pliego reivindicatorio como claro y conciso.

En lo que respecta a la novedad de la presente invención en referencia al documento D1 (US2004/0167320) citado, nos permitimos realizar la siguiente comparación.

Proceso revelado por la invención		Proceso revelado por D1 (De acuerdo a figura 4)
Etapas llevadas a cabo a temperatura de 30°C a 70 °C	a) Ultrafiltración	a) Microfiltración
		b) Ultrafiltración
	b) Diafiltración	c) Diafiltración
		d) Microfiltración
	c) Ultrafiltración	e) Ultrafiltración
		f) Filtración aséptica

Como se ha definido a lo largo de la solicitud, y de la presente respuesta, la invención reivindicada se encuentra referida un proceso para preparar composiciones de anticuerpos altamente concentradas en donde se lleva a cabo una primera ultrafiltración de una primera preparación de anticuerpo para obtener una segunda preparación de anticuerpos que comprende una fracción retenida de la primera ultrafiltración, seguido de una diafiltración de la segunda preparación de anticuerpo para obtener una preparación de anticuerpo intermediaria diafiltrada que comprende una fracción retenida de la diafiltración, y por ultimo una segunda ultrafiltración de la preparación de anticuerpo intermediaria diafiltrada para obtener una tercera preparación de anticuerpo que comprende una fracción retenida de la segunda ultrafiltración. (Ver tabla comparativa)

Ahora bien, notamos que el proceso revelado por el documento D1, más concretamente ilustrado por la figura 4 de la descripción, revela un mayor número de etapas de separación, en donde se destaca que la etapa de ultrafiltración es seguida por una etapa de microfiltración, en donde ésta última está caracterizada porque el anticuerpo a concentrar se encuentra como parte del permeado, es decir, en la porción filtrada, mientras que en todas las etapas del proceso aquí revelado el anticuerpo hace parte de la fracción retenida.

Consideramos relevante resaltar que la membrana usada en la etapa de microfiltración del proceso revelado por D1 presenta un tamaño de poro que va de 0.1 a 10 micrómetros, la cual de acuerdo con la descripción se usa con fines de clarificación, esterilización, remoción de micropartículas, entre otros. Por otra parte, D1 también revela que la etapa de ultrafiltración requiere el uso de membranas que se caractericen por presentar un tamaño de poro inferior, el cual se encuentra entre 0.001 y 0.1 micrómetros, con fines de separación y concentración de moléculas en solución, principalmente biomoléculas, tales como proteínas, péptidos y carbohidratos, y para fines de intercambio de buffers y fraccionamiento grueso.

Así, se hace evidente que D1 se refiere a un proceso que difiere principalmente en la secuencia de etapas de filtración con respecto a la presente invención y que particularmente, no refiere en ningún apartado una etapa de ultrafiltración posterior a la diafiltración de la preparación intermedia de anticuerpos, sino que, como ya mencionó, enseña la microfiltración como etapa subsiguiente de la diafiltración, lo que en definitiva dista de las enseñanzas de la presente invención.

En conclusión, D1 no contiene todas y cada una de las etapas reveladas por la presente invención, propuestas en el orden requerido para obtener un concentrado de anticuerpos con las características aquí reveladas, motivo por el cual nos permitimos concluir que el proceso actualmente reivindicado es novedoso a la luz de las enseñanzas de D1.

En lo que se refiere a la falta nivel inventivo nos permitimos presentar los siguientes argumentos a favor de la invención aquí reivindicada, haciendo énfasis en la discrepancia entre las afirmaciones del señor Examinador y los resultados de un análisis objetivo de las referencias citadas.

Como primera medida queremos hacer énfasis en los aspectos esenciales que definen el presente proceso, reiterando que el mismo está dirigido a la preparación de composiciones altamente concentradas de anticuerpos mediante la aplicación de tres etapas de filtración que deben ser realizadas a temperaturas de 35 a 50°C, encontrando dicho proceso aplicación en la concentración y formulación de anticuerpos purificados a granel que presentan actividad farmacológica, con la finalidad de ser adaptados a un vehículo farmacéutico final.

Así mismo es fundamental, como parte del entendimiento del presente proceso, considerar que el mismo revela que **un aumento en la temperatura** aplicada en cada una de las fases de filtración genera una mejora significativa en el flujo de filtración y sumado a esto da como resultado la obtención de una preparación concentrada en anticuerpos que esencialmente libre de otros agregados, lo cual constituye una mejora radical en el proceso de separación, sin afectar la calidad de los concentrados obtenidos.

En este sentido, nos permitimos remitir al señor Examinador al ejemplo 7 contenido en la descripción, en donde se enseña el efecto de altas temperaturas sobre la calidad de concentrados de anticuerpos. Al respecto, se concluyó lo siguiente,

"La turbidez de la solución permaneció esencialmente inalterada después de las 24 horas a 60 °C. No se observó ningún agregado soluble significativo de E25 inferior a los 70 °C, lo que sugirió que las muestras del producto fueron sustancialmente estables hasta al menos 60 °C y al menos 24 horas."

Además, el señor Examinador puede evidenciar que los ejemplos dados a lo largo de la descripción muestran unánimemente la obtención de rendimientos superiores al 80%, lo

cual es un indicativo de la eficiencia del proceso llevado a cabo a temperaturas superiores a las manejadas en el arte previo, es decir, de 35 a 50°C.

Ahora bien, en lo que se refiere a D2 notamos que dicho documentos centra sus enseñanzas en un método para concentrar una macromolécula contenida en una solución acuosa mediante la aplicación de un polímero orgánico y las fases de ultrafiltración, diafiltración y una ultrafiltración adicional como etapa final. Sin embargo, es fundamental señalar que D2 trata dentro de su contenido el problema de la precipitación de proteínas generado por los polímeros orgánicos co-concentrados principalmente encontrados en el sobrenadante de cultivos celulares producidos a partir de la recolección de cultivos celulares de mamíferos, tal como lo revelan los primeros párrafos de la descripción.

Es vital considerar que a pesar de que dicho documento contempla dentro de sus enseñanzas una primera ultrafiltración seguida de una diafiltración y de una segunda ultrafiltración, es silencioso en lo que se refiere al manejo de una temperatura de proceso de **35-50°C**, lo cual, como ya fue debidamente explicado previamente, corresponde a una característica esencial de la presente invención.

Por el contrario, al realizar una lectura juiciosa de la información enseñada por D2, hemos encontrado que dentro de la materia revelada se menciona la relación existente entre la temperatura y la formación de micelas de polímeros empleados, en donde específicamente se explica que la Temperatura Micelar Crítica (TMC), es decir, la temperatura en la que las micelas comienzan a ser detectables experimentalmente a una concentración dada, del polímero preferido (Pluronic F-68) está alrededor de 30-35°C para concentraciones de 100 g/L y alrededor de 45-50°C para concentraciones de 10g/L, es decir, que la formación de micelas se da a bajas concentraciones del polímero orgánico a medida que se incrementa la temperatura, lo cual afectaría directamente el proceso de filtración.

De esta manera, es claro que el normalmente versado en la materia, basándose en las enseñanzas de D2 no encontraría una guía para considerar **el incremento de la temperatura** del proceso de filtración a más de 30°C con fines de lograr una optimización del mismo ya que como queda claro de las enseñanzas de D2, el incremento de temperatura va en detrimento de la estabilidad de la formulación al incrementarse la formación de micelas. En conclusión no consideramos que las enseñanzas dadas por D2 indiquen de forma alguna como llegar al proceso de la presente solicitud y por tanto el proceso aquí reivindicado es inventivo a la luz de D2.

Por otra parte nos permitimos aclarar al señor Examinador que D3 constituye una guía general que brinda información referente a métodos de filtración de flujo tangencial con fines de clarificación, concentración y purificación de proteínas.

Si bien es cierto dicha guía contiene información en la cual expone que la **disminución de la temperatura** de cualquier proceso de filtración genera un aumento en la viscosidad y ligado a esto una disminución en el flujo de filtración, lo cual es objeto de interés como esfuerzo para minimizar la degradación de la calidad del producto filtrado, en ningún fragmento de D3 se enseña, ni se sugiere, **el incremento de la temperatura** de filtración como factor generador de un aumento de la velocidad de flujo. Esto queda claro de la lectura de D3 como exponemos a continuación:

"Disminuir la temperatura de proceso a la cual se lleva cabo es un método a menudo utilizado la Filtración de Flujo Tangencial (TFF) para intentar minimizar la degradación en la calidad del producto".

Conforme a lo anterior, no encontramos como el versado en la materia encontraría motivación alguna en generar un **incremento en la temperatura tal como se revela en la presente invención**, cuando en D3 lo que se sugiere es la disminución de la misma para conservar la calidad del producto objeto de filtración.

Por lo tanto, consideramos que con la información contenida en D2 y D3, el versado en la materia no encontraría motivación alguna para modificar las condiciones de temperatura con el fin de generar una optimización del proceso, considerando que tanto en D2 como en D3 hay sugerencia claras de que un aumento en la temperatura generaría, disminución del flujo de filtración y degradación del producto, respectivamente. Por tanto, concluimos que la presente invención cuenta con nivel inventivo a la luz de D3, y más aun a la luz de la combinación de D2 y D3.

En conclusión, la afirmación del señor examinador según la cual "la persona versada en la materia a partir de proceso divulgado en D2 y las indicaciones de D3 del efecto de la temperatura en estos procesos habría llegado al proceso reclamado" no es posible en vista de las enseñanzas del arte previo ya que el mismo aleja al versado en la materia en el sentido de incrementar la temperatura del proceso de acuerdo a lo anteriormente expuesto.

Solicitud divisional

Adicionalmente nos permitimos informar al señor Examinador que procederemos a la presentación de una solicitud divisional, en la cual se presenta un pliego reivindicatorio compuesto por cuarenta y cuatro (44) reivindicaciones, para que sea objeto de estudio de su Oficina.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la concesión del privilegio solicitado, ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la decisión 486.

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.SJ.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar composiciones de anticuerpo altamente concentradas que comprende:
 - a) una primera ultrafiltración de una primera preparación de anticuerpo para obtener una segunda preparación de anticuerpos que comprende una fracción retenida de la primera ultrafiltración;
 - b) una diafiltración de la segunda preparación de anticuerpo para obtener una preparación de anticuerpo intermediaria diafiltrada que comprende una fracción retenida de la diafiltración; y
 - c) una segunda ultrafiltración de la preparación de anticuerpo intermediaria diafiltrada para obtener una tercera preparación de anticuerpo que comprende una fracción retenida de la segunda ultrafiltración;caracterizado porque, las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de 35 °C a 50 °C.
2. El proceso de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque una o más de las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de 45°C.
3. El proceso de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque una o más de las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de 40°C a 50°C.
4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, CARACTERIZADO porque las etapas b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de 40°C a 50°C.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, CARACTERIZADO porque las etapas a), b) y c) se llevan a cabo a una temperatura de 40°C a 50°C.
6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, CARACTERIZADO porque la velocidad de filtración es suficiente para permitir la terminación de las etapas combinadas a), b) y c) en un tiempo de 1 a 10 horas.
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, CARACTERIZADO porque la velocidad de filtración es suficiente para permitir la terminación de las etapas combinadas a), b) y c) en un tiempo de 2 a 5 horas.
8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque la velocidad de filtración es suficiente para permitir la terminación de las etapas combinadas a), b) y c) en 3 horas.
9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, CARACTERIZADO porque la primera preparación de anticuerpo tiene una concentración de proteína de 0.1 a 10 gramos por litro.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque la primera preparación de anticuerpo tiene una concentración de proteína de 1 a 5 gramos por litro.
11. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de anticuerpo tiene una concentración de proteína de 50 a 250 gramos por litro.

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de anticuerpo tiene una concentración de proteína de 100 a 230 gramos por litro.
13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de anticuerpo tiene una concentración de proteína de 170 a 200 gramos por litro.
14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, CARACTERIZADO porque el rendimiento total para la etapa c) es de 0.24 gr/m²/s, 0.36 gr/m²/s, 0.40 gr/m²/s, 0.45 gr/m²/s, 0.52 gr/m²/s, 0.54 gr/m²/s, 0.79 gr/m²/s, 0.85 gr/m²/s o 0.87 gr/m²/s.
15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, CARACTERIZADO porque el rendimiento de la tercera preparación de anticuerpo desde las etapas combinadas a), b) y c) es superior a 70% en peso.
16. El proceso de acuerdo con la reivindicación 15, CARACTERIZADO porque el rendimiento de la tercera preparación de anticuerpo desde las etapas combinadas a), b) y c) es de 80% en peso a 100% en peso.
17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 15, CARACTERIZADO porque el rendimiento de la tercera preparación de anticuerpo desde las etapas combinadas a), b), y c) es superior a 98% en peso.
18. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, CARACTERIZADO porque los niveles de contaminantes agregados son inferiores al 5% en peso.
19. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, CARACTERIZADO porque los niveles de contaminantes agregados son inferiores al 2% en peso.

20. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, CARACTERIZADO porque las etapas de filtración a), b) y c), utilizan una membrana de ultrafiltración.
21. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, CARACTERIZADO porque las etapas de filtración a), b), y c) se logran por medio de un flujo tangencial a través de una membrana de ultrafiltración.
22. El proceso de acuerdo con la reivindicación 21, CARACTERIZADO porque el primer y segundo ultrafiltrado, y el diafiltrado se logran por medio de un flujo tangencial a través de la misma membrana de ultrafiltración.
23. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, CARACTERIZADO porque una membrana de ultrafiltración utilizada en las etapa de filtración a) es usada en la etapa b) y en la etapa c).
24. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20-23, CARACTERIZADO porque la membrana de ultrafiltración comprende una membrana de ultrafiltración con componente de celulosa regenerada.
25. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20-24, CARACTERIZADO porque la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro nominal de 5 a 50 kilo Daltons.
26. El proceso de acuerdo con la reivindicación 25, CARACTERIZADO porque la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro nominal de 10 a 30 kilo Daltons.
27. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26, CARACTERIZADO porque la primera preparación de anticuerpo comprende una proteína que tiene un peso molecular aparente de 100 a 200 kilo Daltons.

28. El proceso de acuerdo con la reivindicación 27, CARACTERIZADO porque la primera preparación de anticuerpo comprende un anticuerpo que tiene un peso molecular aparente de 150 kilo Daltons.
29. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-28, CARACTERIZADO porque la diafiltración intercambia un búfer que tiene una composición que difiere de aquella de la etapa a).
30. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29, CARACTERIZADO porque la etapa de diafiltración intercambia fluido a un volumen sustancialmente constante, una concentración de proteína sustancialmente constante, o ambas.
31. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-30, CARACTERIZADO porque la primera ultrafiltración tiene una velocidad de recirculación de cerca de 0,005381955 m³/min/m² a cerca de 0,053819552 m³/min/m².
32. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-30, CARACTERIZADO porque las etapas combinadas a), b), y c) se logran a una presión transmembrana de 10 a 50 p.s.i.
33. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de anticuerpo tiene una biocarga detectable inferior a 100 unidades formadoras de colonia (UFC)/ml.
34. El proceso de acuerdo con la reivindicación 33, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de anticuerpo tiene una biocarga detectable de 1.8 UFC/ml.
35. El proceso de acuerdo con la reivindicación 33, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de anticuerpo tiene una biocarga detectable inferior a 0.13 UFC/ml.

36. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-35, CARACTERIZADO porque la primera preparación de anticuerpo ha sufrido una etapa de purificación antes de la etapa (a).
37. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-36, CARACTERIZADO porque el anticuerpo contenido en la primera preparación de anticuerpo es de aproximadamente el 99,8% de pureza antes de la etapa (a).
38. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-35, CARACTERIZADO porque la segunda preparación de anticuerpo tiene una concentración de proteína de 20 a 50 gramos por litro.
39. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y 14-38, CARACTERIZADO porque la preparación de anticuerpo intermediaria diafiltrada tiene una concentración de anticuerpo de 25 a 35 gramos por litro y la tercera preparación de proteína tiene una concentración de proteína de 170 a 200 gramos por litro.
40. Un proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y 14-38, CARACTERIZADO porque la primera ultrafiltración concentra la primera preparación de anticuerpo para obtener la segunda preparación de anticuerpo que tiene una concentración de anticuerpo de 30 gramos por litro y la segunda ultrafiltración concentra la preparación de anticuerpo intermediaria diafiltrada para obtener la tercera preparación de anticuerpo que tiene una concentración de proteína de 170 a 200 gramos por litro.
41. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 y 24-40, CARACTERIZADO porque la primera y segunda ultrafiltración se logran a través de la misma membrana ultra-filtro.
42. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-41, CARACTERIZADO porque la diafiltración logra un intercambio de búfer en un volumen de 5 a 15 veces mayor.

43. El proceso de acuerdo con la reivindicación 42, CARACTERIZADO porque la diafiltración logra un intercambio de búfer en un volumen de 8 veces mayor.
44. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-43, CARACTERIZADO porque la etapa (b) comprende más de una etapa de diafiltración.
45. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43, CARACTERIZADO porque la diafiltración intercambia un primer búfer por un segundo búfer.
46. El proceso de acuerdo con la reivindicación 45, CARACTERIZADO porque el primer búfer comprende una mezcla de cloruro de sodio acuoso y un búfer TRIS, y el segundo búfer comprende una mezcla de cloruro de histidina y cloruro de arginina acuosos.
47. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-46, CARACTERIZADO porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
48. El proceso de la reivindicación 47, CARACTERIZADO porque el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
49. El proceso de la reivindicación 47, CARACTERIZADO porque el anticuerpo es un fragmento de unión al antígeno seleccionado del grupo que consiste de fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')₂, y fragmento Fv.
50. El proceso de acuerdo con la reivindicación 47, CARACTERIZADO porque el anticuerpo comprende un anticuerpo anti-IgE.
51. El proceso de la reivindicación 50, CARACTERIZADO porque el anticuerpo anti-IgE es el anticuerpo rhuMAb E25.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

AS. 122.600

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 ☒															
<u>GENENTECH, INC. y NOVARTIS AG</u>																	
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 _____															
<table><tr><td>Nacionalidad/País de constitución</td><td>Dirección y domicilio del titular</td><td>Ciudad</td></tr><tr><td>Estados Unidos de América</td><td>1 DNA Way, CA 94080</td><td>South San Francisco</td></tr><tr><td>Suiza</td><td>Lichstrasse 35, CH-4056</td><td>Basel</td></tr><tr><td>Dirección electrónica</td><td>No. Fax</td><td>Número telefónico</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>			Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad	Estados Unidos de América	1 DNA Way, CA 94080	South San Francisco	Suiza	Lichstrasse 35, CH-4056	Basel	Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico			
Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad															
Estados Unidos de América	1 DNA Way, CA 94080	South San Francisco															
Suiza	Lichstrasse 35, CH-4056	Basel															
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

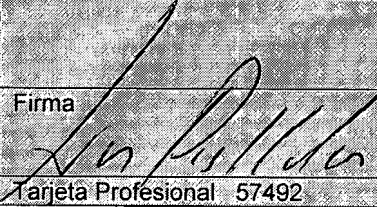
3. Datos del apoderado:														
<u>CADENA SARMIENTO JUAN PABLO</u>	<u>80.410.337</u>	<u>57492</u>												
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional												
<table><tr><td>Dirección y domicilio</td><td>Ciudad</td></tr><tr><td>Calle 70 A #4-41</td><td>Bogotá, D.C.</td></tr><tr><td>Dirección electrónica</td><td>No. Fax</td></tr><tr><td></td><td>742-2200</td></tr><tr><td></td><td>Número telefónico</td></tr><tr><td></td><td>744-2200</td></tr></table>			Dirección y domicilio	Ciudad	Calle 70 A #4-41	Bogotá, D.C.	Dirección electrónica	No. Fax		742-2200		Número telefónico		744-2200
Dirección y domicilio	Ciudad													
Calle 70 A #4-41	Bogotá, D.C.													
Dirección electrónica	No. Fax													
	742-2200													
	Número telefónico													
	744-2200													
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____														

219

4. Datos del trámite		
CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente:	Expediente: 07 021.228	Expediente:
De:	De:	De:
A:	A:	A:

5. Anexos	
Comprobante de pago No. 12 - 105870	Fecha: 08.10.12

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

122600 3/20

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 105870	
				Bogotá D.C., Octubre 08 de 2012 - 17:30:12	
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	446248482	08/10/2012	41.491.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	590.000.00	590.000.00	
				\$590.000.00	
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Octubre 8 de 2012 - 17:30:20					

8

PROCESO PARA LA CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS Y PRODUCTOS TERAPÉUTICOS DE LOS MISMOS

Antecedentes de la Invención

Los métodos para aislar, purificar y concentrar materiales biológicos son conocidos e incluyen, por ejemplo, cromatografía, ultrafiltración, y liofilización, véase en general R. Hatti-Kaul y otros, "Downstream Processing in Biotechnology" en *Basic Biotechnology*, capítulo 9, páginas 187-211, 2da ed., Cambridge University Press (2001). Los procesos para realizar preparaciones concentradas de anticuerpos monoclonales para administración en seres humanos son conocidos; véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6.252.055, que usa ultrafiltración y que recircula el filtrado resultante.

Algunos desafíos relacionados con los métodos disponibles de concentración de anticuerpos incluyen, por ejemplo, flujos bajos, tiempos de procesos prolongados, áreas grandes de membranas, pérdidas y rendimiento de recuperación mecánica, administración o intervención intensiva del operador, tasas bajas de transferencia de masa, ineficiencias de energía, y límites de presión hidráulica en equipos de concentración. Estos y otros desafíos pueden contribuir a un costo total de fabricación alto y a costos posteriores aún más altos para los consumidores de drogas terapéuticas.

Existe la necesidad de procesos mejorados para preparar formulaciones proteicas altamente concentradas, tales como preparaciones líquidas de anticuerpos y productos terapéuticos de las mismas.

Resumen

En términos generales, la presente invención se relaciona con procesos para concentrar proteínas, tales como procesos para concentrar una preparación de anticuerpos, formulaciones farmacéuticas que contienen tal preparación, y su uso en terapia en seres humanos o animales.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee procesos para preparar proteínas altamente concentradas, tales como preparaciones de anticuerpos; y productos terapéuticos preparados mediante el proceso, tales como productos de anticuerpos terapéuticos. En consecuencia, la presente invención provee un proceso para concentrar proteínas que comprende: una primera ultrafiltración de una primera preparación de anticuerpos para proveer una segunda preparación de anticuerpos; una diafiltración de la segunda preparación

de anticuerpos para proveer una preparación de anticuerpos intermediaria diafiltrada; y una segunda ultrafiltración de la preparación de anticuerpos intermediaria diafiltrada para proveer una tercera preparación de anticuerpos, en donde una o más de la primera ultrafiltración, la segunda ultrafiltración y la diafiltración se logran a temperaturas elevadas, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C.

La presente invención también provee, en las realizaciones, un proceso para concentrar proteínas que comprende: una primera ultrafiltración de una primera mezcla proteica para proveer una segunda mezcla proteica; una diafiltración de la segunda mezcla proteica para proveer una mezcla proteica diafiltrada; y una segunda ultrafiltración de la mezcla proteica diafiltrada para proveer una tercera mezcla proteica, en donde una o más de las primera ultrafiltración, la diafiltración y la segunda ultrafiltración se logran a, por ejemplo, aproximadamente 45 °C.

La presente invención provee también, en las realizaciones, una composición de anticuerpos altamente concentrada preparada mediante los procesos anteriormente descritos.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 ilustra un aparato para lograr el proceso preparativo, en las realizaciones de la presente invención.

FIGS. 2 a 17 ilustran varios valores de procesos observados y medidos con respecto a varias fases o modalidades del proceso, en las realizaciones de la presente invención.

FIGS. 18 y 19 ilustran el efecto de la temperatura elevada en la calidad del producto, en las realizaciones de la presente invención.

FIGS. 20 y 21 ilustran el efecto de la temperatura elevada en el control de biocarga, en las realizaciones de la presente invención.

FIG. 22 ilustra el efecto de la temperatura elevada en el flujo del proceso y el tiempo del proceso, en las realizaciones de la presente invención.

FIGS. 23 a 25 ilustran varios valores de proceso observados o medidos con respecto a varias fases o modalidades del proceso en escala, en las realizaciones de la presente invención.

Descripción detallada

Varias realizaciones de la presente invención se describirán en detalle con referencia a los dibujos. La referencia a varias realizaciones no limita el alcance de

la invención, que se limita solamente mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Asimismo, cualquier ejemplo mencionado en esta memoria descriptiva no intenta ser limitativo y meramente ilustra algunas de las muchas posibles realizaciones de la invención reivindicada.

Las siguientes expresiones, a menos que se indique lo contrario:

"Ultrafiltrar," "ultrafiltración," "ultrafiltrado," "UF" y términos similares se refieren, por ejemplo, a la utilización de membranas sintéticas semipermeables, con propiedades químicas y físicas apropiadas, para discriminar entre moléculas en la mezcla, principalmente sobre la base del tamaño y forma molecular, y lograr la separación de diferentes moléculas o lograr la concentración de moléculas similares.

"Diafiltrar", "diafiltración," "diafiltrado," "DF" y términos similares se refieren, por ejemplo, a la utilización de una membrana de ultrafiltración para extraer, reemplazar o reducir la concentración de sales o solventes de soluciones o mezclas que contienen proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, u otras biomoléculas.

"Presión transmembrana" o "PTM" se refiere a la presión promedio aplicada del lado del filtrado de la membrana calculado como $PTM [bar] = [(P_A + P_R)/2] - P_f$, en donde P_A es la presión de alimentación, P_R es la presión del retentado, y P_f es la presión del filtrado.

"Filtración de flujo tangencial," "filtración de flujo cruzado," "FFT" y términos similares se refieren al modo de filtración en el que la solución que contiene solutos pasa tangencialmente a través de la membrana UF y las sales o solutos de pesos moleculares inferiores atraviesan la misma al aplicar presión.

"Anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunológico que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. Descrito en términos de su estructura, un anticuerpo es una proteína en forma de Y que consiste de cuatro cadenas de aminoácidos, dos pesadas y dos livianas. En un modelo simplificado suficiente para su ejemplificación, cada anticuerpo tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable, localizada en los extremos de los brazos de la Y, se une e interactúa con el antígeno buscado. Esta región variable incluye una región

de determinación complementaria (RDC) que reconoce y se une a un sitio de enlace específico en un antígeno particular. La región constante, localizada en la cola de la Y, es reconocida e interactúa con el sistema inmunológico (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ta Ed., Garland Publishing, New York). Un antígeno buscado por lo general tiene numerosos sitios de enlace, también llamados epítopes, reconocidos por las RDCs en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se enlaza específicamente a diferentes epítopes tiene una estructura diferente. Por ende, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente.

El término "aproximadamente" que modifica, por ejemplo, la cantidad de un ingrediente en las composiciones, concentración de un activo, volúmenes de buffer, diavolúmenes, tamaño de poro, peso molecular aparente, límite de peso molecular, temperatura del proceso, tiempo del proceso, rendimientos, tasas de flujo, presiones, biocargas, y valores similares, y rangos de los mismos, cuando es empleado en los métodos de la invención, se refiere a una variación en la cantidad numérica que ocurre, por ejemplo, a través de los procedimientos de administración y medición típicos usados para hacer concentrados o usar soluciones; a través de errores inadvertidos en estos procedimientos, a través de diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes empleados para hacer las composiciones o llevar a cabo los métodos, o consideraciones similares. El término "aproximadamente" abarca también las cantidades que difieren a causa de la antigüedad de una composición con una concentración o mezcla inicial particular. El término "aproximadamente" abarca también las cantidades que difieren como consecuencia de mezclar o procesar una composición con una concentración o mezcla inicial particular. Ya sea que estén o no modificadas por el término "aproximadamente" las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades.

"Consistiendo esencialmente de" se refiere a un proceso para obtener una composición proteica concentrada o composición de anticuerpos que incluye los pasos e ingredientes que no afectan materialmente las propiedades básicas y novedosas de la composición, tales como multiplicidad de pasos o medios buffer. Los ingredientes que afectan en forma material las propiedades básicas de la composición y el método de la presente invención imparten características indeseables incluyendo, por ejemplo, biocarga, tal como la toxicidad o irritabilidad indeseables asociadas con los contaminantes.

Debe entenderse que el artículo indefinido “un” o “una” y sus correspondiente artículo definidos “el” o “la” según se utilizan en la presente significan al menos uno, o uno o más, a menos que se especifique lo contrario.

La presente invención provee, en las realizaciones, los procesos mencionados con anterioridad y los productos de anticuerpos concentrados de los mismos.

En las realizaciones de la presente invención, los procesos preparativos y los productos de los mismos se pueden utilizar para realizar preparaciones de anticuerpos altamente concentradas y preparaciones similares tales como para purificar y concentrar proteínas o sustancias similares de fuentes naturales o sintéticas, y cuyos productos pueden ser útiles para tratar condiciones patológicas, tales como asma, cáncer, psoriasis, inhibir angiogénesis y condiciones patológicas similares.

A continuación se ejemplifica de manera adicional cómo hacer y usar los procesos preparativos y productos de la invención en las realizaciones de los procesos descritos con anterioridad para preparar composiciones de anticuerpos altamente concentradas de la invención:

En las realizaciones de la presente invención, se provee un proceso para preparar composiciones de anticuerpos altamente concentradas, por ejemplo, de acuerdo con el logro de los siguientes pasos en el orden establecido, que comprenden:

una primera ultrafiltración de una primera preparación de anticuerpos, que tiene una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 gramos por litro (g/L), para proveer una segunda preparación de anticuerpos como el retentado, que tiene una concentración de anticuerpos mayor de, por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 gramos por litro;

una diafiltración de la segunda preparación de anticuerpos resultante para proveer una preparación de anticuerpos intermediaria diafiltrada como el retentado, que tiene aproximadamente la misma concentración que el segundo retentado resultante de la preparación de anticuerpos, es decir, una diafiltración para lograr un intercambio del buffer a un volumen constante; y

una segunda ultrafiltración de la preparación de anticuerpos intermediaria diafiltrada para proveer una tercera preparación de anticuerpos como el retentado, que tiene una concentración de anticuerpos mayor de, por ejemplo, aproximadamente 150 a aproximadamente 200 gramos por litro.

Los procesos preparativos de la invención pueden comprender, además, un paso o más pasos opcional(es) de recuperación de producto, por ejemplo, y según se ilustra y revela en la presente.

En la realizaciones del proceso anteriormente descrito de la invención, una o más de las primera ultrafiltración, la diafiltración y la segunda ultrafiltración, se pueden efectuar a, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C. En las realizaciones, estos pasos se pueden efectuar a, por ejemplo, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C. En las realizaciones, estos pasos se pueden efectuar a, por ejemplo, de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C. En las realizaciones, estos pasos se pueden efectuar a, por ejemplo, de aproximadamente 45 °C, tal como de aproximadamente 45 °C más o menos 5 °C. Dependiendo del tipo de preparación de anticuerpos, para los procesos logrados a temperaturas mayores de aproximadamente 70 °C, la preparación puede mostrar signos de deterioro, tales como desnaturalización, aglomeración y fenómenos similares. Para los procesos logrados a temperaturas inferiores de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C, las tasas de flujo son por lo general indeseablemente bajas y los tiempos del proceso son indeseablemente largos, ocasionando que los procesos a temperaturas inferiores sean menos atractivos para la producción comercial eficiente.

En las realizaciones, la primera preparación de anticuerpos puede tener una concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 gramos por litro (g/L). La concentración de anticuerpos es, por ejemplo, una concentración común típicamente disponible de otros métodos o pasos de purificación de anticuerpos o proteínas preliminares, tales como centrifugación, filtración, cromatografía, y procedimientos similares. La segunda preparación de anticuerpos resultante obtenible de la primera ultrafiltración puede tener una concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 gramos por litro y, por ejemplo, aproximadamente 20 a aproximadamente 40 gramos por litro, tales como 30 gramos por litro. Un rango para la concentración de anticuerpos de la preparación de anticuerpos intermedia puede depender de, por ejemplo, un equilibrio de factores, tales como volumen de muestra y flujo de muestra obtenible con un buffer particular que contiene la segunda preparación de anticuerpos. La preparación de anticuerpos intermedia puede tener una concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 25 a aproximadamente 35 gramos por litro y la tercera preparación de anticuerpos puede tener una concentración de anticuerpos de, por

ejemplo, aproximadamente 170 a aproximadamente 200 gramos por litro. La tercera preparación de anticuerpos, en las realizaciones, puede tener una concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 50 a aproximadamente 250 gramos por litro, tal como de aproximadamente 100 a aproximadamente 230 gramos por litro, y de aproximadamente 170 a aproximadamente 200 gramos por litro, tal como 185 gramos por litro.

Será aparente para una persona versada en el arte, al comprender la presente invención, que la preparación de anticuerpos intermediaria y la tercera preparación de anticuerpos comprenden el mismo retentado ultrafiltrado salvo por, por ejemplo, las diferencias en la concentración de anticuerpos resultantes de la primera y segunda concentración de ultrafiltración, y las diferencias en el medio de buffer en suspensión resultante del intercambio del buffer de diafiltración. Por ende, si llegara a existir, existe un cambio mínimo en la composición, tal como degradación, de la proteína o anticuerpo buscado, en las realizaciones de la presente invención.

Los métodos de concentración de ultrafiltración convencional pueden tener generalmente tiempos más prolongados y menores eficiencias en el rendimiento con tiempos de proceso considerablemente mayores tales como procesos de varios días a varias semanas, o procesos de volúmenes considerablemente inferiores, o ambos.

En las realizaciones, el proceso de concentración proteica de la invención se puede lograr, por ejemplo, en aproximadamente 1 a 10 horas, preferentemente en aproximadamente 2 a 5 horas, y más preferentemente en aproximadamente 3 horas. Las preferencias favorecen los rendimientos de flujos más altos y áreas de membranas más pequeñas.

En las realizaciones, la primera ultrafiltración se puede lograr, por ejemplo, en aproximadamente 35 % del tiempo total de proceso. En consecuencia, por ejemplo, en un proceso de concentración y purificación de la invención con aproximadamente 3 horas de tiempo total de proceso, la primera ultrafiltración se puede lograr en aproximadamente 45 minutos. En las realizaciones, la segunda ultrafiltración se puede lograr, por ejemplo, en aproximadamente 15 % del tiempo total de proceso. Por ende, por ejemplo, en un proceso de la invención de aproximadamente 3 horas de tiempo total de proceso, la segunda ultrafiltración se puede lograr en aproximadamente 15 minutos. La diafiltración se puede lograr, por ejemplo, en aproximadamente 50 % del tiempo total del proceso. En consecuencia, por ejemplo, en un proceso de la invención con aproximadamente 3

horas de tiempo total del proceso, la diafiltración se puede lograr en aproximadamente 90 a aproximadamente 120 minutos.

En las realizaciones, la primera ultrafiltración y la segunda ultrafiltración se pueden lograr, por ejemplo, con una membrana ultra filtro que tiene un tamaño de poro nominal o límite de peso molecular, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kilo Daltons. Otro tamaño de poro nominal adecuado es, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kilo Daltons. Otro tamaño de poro nominal adecuado, o límite de peso molecular, es de aproximadamente 30 kilo Daltons.

En las realizaciones, la primera preparación de anticuerpos puede contener, por ejemplo, un anticuerpo que tiene un peso molecular aparente de, por ejemplo, aproximadamente 100 a aproximadamente 200 kilo Daltons. En otras realizaciones, la primera preparación de anticuerpos pueden contener un anticuerpo que tiene un peso molecular aparente de, por ejemplo, aproximadamente 150 kilo Daltons, tal como cuando la preparación de anticuerpos comprende anticuerpos antiIgE o IgE, véase por ejemplo, la patente estadounidense No. 6.172.213 asignada a Genentech, Inc.

Otros anticuerpos adecuados para uso en la presente invención incluyen anticuerpos para el tratamiento de cáncer, véase generalmente, por ejemplo: PCT/US02/19592; PCT/US01/20118; PCT/US01/25464; PCT/US01/26626; PCT/US02/28859; PCT/US02/41798; PCT/US02/12206; PCT/US03/11148; PCT/US02/12619; y PCT/US02/33050. Otros anticuerpos adecuados para el uso en la presente invención incluyen un anticuerpo antiCD20 y anticuerpos similares que incluyen formas quiméricas, híbridas, murinos, no humanas y humanas. Véase, por ejemplo, la patente U.S. No. 6.582.959 (VEGF) y la solicitud de patente U.S. No. 2002/0122797 A1 (VEGF humano).

En las realizaciones, los anticuerpos incluidos dentro del alcance de la invención incluyen anticuerpos recombinantes e híbridos (por ejemplo, anticuerpos "humanizados" y "humanos") independientemente de las especies de origen o clase de inmunoglobulina o designación de subclase, así como también fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y F_v). Véase la patente U.S. No. 4.816.567; Mage y Lamoyi, en *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987).

Los anticuerpos monoclonales también se pueden utilizar y se pueden aislar de librerías de anticuerpos de fagos usando la técnicas descritas en Clackson y otros (1991) *Nature*, 352:624-628 y Marks y otros (1991) *J. Mol. Biol.*,

222:581-597, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos "quiméricos" en donde una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes a los anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como también fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Pat. US No. 4.816.567; y Morrison y otros (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos pueden incluir anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias que enlazan antígenos de dominio variable, derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del antiguo mundo, simio, etc) y secuencias de regiones constantes humanas.

Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos a un sitio antigénico simple. Asimismo, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos a diferentes determinantes (epítopes) cada anticuerpo monoclonal está dirigido a un determinante simple en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos al poder sintetizarse sin contaminarse mediante otros anticuerpos. Por esta razón, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de tal población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por posibles mutaciones que ocurren naturalmente, que pueden estar presentes en cantidades menores, y no debe construirse como requiriendo producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para uso en esta invención pueden realizarse usando el método de hibridoma descrito primero por Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495 (1975), o mediante métodos de ADN recombinante. Otros métodos conocidos de producción de anticuerpos se describen, por ejemplo, en Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103, Academic Press (1986); Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984). Brodeur, y otros, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987).

Varios métodos han sido empleados para producir anticuerpos monoclonales (AcMs). La tecnología del hibridoma, que se refiere a una línea celular clonada que produce un tipo simple de anticuerpo, utiliza las células de

varias especies, incluyendo ratones (murino), hámsters, ratas y seres humanos. Otro método para preparar AcMs utiliza ingeniería genética incluyendo técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales formados a partir de estas técnicas incluyen, entre otros, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo quimérico combina las regiones codificadas de ADN de más de un tipo de especie. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede derivar de la región variable de un ratón y la región constante de un humano. Un anticuerpo humanizado proviene predominantemente de un ser humano, aunque contenga porciones no humanas. Como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado puede contener una región constante completamente humana. No obstante, contrariamente a un anticuerpo quimérico, la región variable puede derivar parcialmente de un humano. Las porciones sintéticas no humanas de un anticuerpo humanizado provienen a menudo de RDCs en anticuerpos murinos. De todas formas, estas regiones son cruciales para permitir que el anticuerpo reconozca un antígeno específico y se enlace al mismo.

De acuerdo con lo descrito, los anticuerpos murinos juegan un rol importante en la tecnología del anticuerpo. Si bien son útiles para los diagnósticos y las terapias a corto plazo, los anticuerpos murinos no se pueden administrar en pacientes a largo plazo sin incrementar el riesgo de una respuesta inmunogénica perjudicial. Esta respuesta, llamada anticuerpo humano antiratón (AHAR), existe cuando el sistema inmunológico de un humano reconoce el anticuerpo murino como extraño y lo ataca. Una respuesta de AHAR puede causar shock tóxico o incluso la muerte. Los anticuerpos humanizados y quiméricos reducen la probabilidad de una respuesta de AHAR al minimizar las porciones no humanas de los anticuerpos administrados. Asimismo, los anticuerpos humanizados y quiméricos tienen el beneficio adicional de activar respuestas inmunes humanas secundarias, tales como citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo.

“Los fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente comprendiendo la región de enlace al antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados de (un) fragmento(s) de anticuerpos.

Un anticuerpo “intacto” es el que comprende una región variable de enlace al antígeno así como también un dominio constante de cadena liviana (CL) y dominios constantes de cadenas pesadas, CP1, CP2 y CP3. Los dominios

14
31

constantes pueden ser dominios constantes de secuencias nativas (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de secuencia de aminoácido de los mismos. El anticuerpo intacto puede tener una o más “funciones efectoras” que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante de secuencia de aminoácido) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen enlace C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; enlace de receptor Fc; citotoxicidad célula mediada dependiente del anticuerpo (CCDA); fagocitosis; regulación baja de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor celular B; BCR), etc.

Dependiendo de la secuencia de aminoácido del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes “clases”. Existen cinco clases mayores de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y muchas de estas clases se pueden dividir adicionalmente en “subclases” (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a diferentes clases de anticuerpos se llaman α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tri-dimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

En las realizaciones, la primera ultrafiltración concentra la primera preparación de anticuerpos para proveer la segunda preparación de anticuerpos que tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 30 gramos por litro, y la segunda ultrafiltración concentra la preparación de anticuerpos intermedia (obtenida a partir de la diafiltración) para proveer la tercera preparación de anticuerpos que tiene una concentración de anticuerpos de, por ejemplo, aproximadamente 170 a aproximadamente 200 gramos por litro. La primera ultrafiltración y la segunda ultrafiltración se pueden lograr con la misma membrana ultrafiltro y, de desearse, dentro del mismo recipiente o circuito de proceso, por ejemplo, para minimizar la manipulación, pérdidas, escapes, e impactos similares en el rendimiento, eficiencia y economía. La primera ultrafiltración y la segunda ultrafiltración se pueden lograr con cualquier aparato ultrafiltro o membrana ultrafiltro adecuados. Muchos aparatos ultrafiltro o membranas ultrafiltro, aptos para la operación de filtración de flujo tangencial (FFT) para lograr ultrafiltraciones y diafiltraciones, se encuentran comercialmente disponibles, tales como Millipore, Pall Corp., Sartorius, y otros proveedores. En las realizaciones, una membrana ultrafiltro adecuada puede ser, por ejemplo,

cualquier componente de celulosa regenerado que tiene un perfil de adsorción proteica relativamente bajo comparado con otras membranas ultrafiltro disponibles, tales como polietersulfona.

La operación de diafiltración intercambia una primera composición del buffer presente en las primera y segunda preparaciones de anticuerpos para un segundo buffer deseado en la tercera preparación de anticuerpos. En las realizaciones, el primer buffer puede comprender, por ejemplo, una mezcla de cloruro de sodio acuoso y un buffer de TRIS, y un segundo buffer puede comprender, por ejemplo, una mezcla de cloruro de histidina y cloruro de arginina acuosos. La diafiltración puede lograr un intercambio de buffer a volumen constante, concentración constante, o ambos. En las realizaciones, la diafiltración logra un intercambio de buffer a volumen constante y concentración constante. La diafiltración puede lograr un intercambio del buffer, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 veces en volumen (es decir, diavolumenes). La diafiltración puede lograr también un intercambio del buffer, por ejemplo, de aproximadamente 8 veces en volumen (8 diavolumenes), es decir, 8 veces el volumen de la muestra que contiene la preparación de anticuerpos a ser intercambiados. Por ejemplo, una preparación de anticuerpos de 10 litros se puede diafiltrar con un volumen 5 veces mayor (diavolumenes) o volumen de 50 litros del buffer de intercambio. El volumen de intercambio y preferencias para los volúmenes de intercambio representa un equilibrio de factores, por ejemplo, eficiencias de rendimiento del proceso, pureza del producto, estándares de aceptación gubernamentales y cliente / paciente, y estándares similares, y puede depender de, por ejemplo, la concentración y el tipo de buffer (por ejemplo, el primer buffer) en la primera preparación de anticuerpos, y consideraciones similares.

La primera ultrafiltración, la segunda ultrafiltración y la diafiltración son preferentemente realizadas con filtración de flujo tangencial (modalidad FFT) a través de una membrana ultrafiltro, y la membrana ultrafiltro es preferentemente la misma membrana para cada paso. El rendimiento del producto en el combinado de fracciones o, simplemente, combinado ("pool") final (es decir, la tercera preparación de anticuerpos) puede ser, por ejemplo, mayor de aproximadamente 70 % en peso, tal como aproximadamente de 80 % a aproximadamente 100 % en peso basado en el peso de los anticuerpos en la primera preparación de anticuerpos. El rendimiento de la tercera preparación de anticuerpos puede ser, en las realizaciones, mayor que aproximadamente 90 % en peso, en las

realizaciones, mayores que aproximadamente 95 % en peso, y en las realizaciones, aún mayores que aproximadamente 98 % en peso, basado en el peso de los anticuerpos en la primera preparación de anticuerpos.

La primera ultrafiltración puede tener una tasa de recirculación de, por ejemplo, aproximadamente 0,83 a 16,67 mL/s (50 a 1.000 mL/min), y preferentemente de aproximadamente 1,67 a 16,67 mL/s (100 a 1.000 mL/min). La tasa de recirculación puede ascender de acuerdo con el área de membrana disponible, por ejemplo, áreas de membrana de 0,46; 1,86; 18,6; y 92,9 m² (5, 20, 200, y 1.000 pies cuadrados), y áreas similares permiten tasas de recirculación incrementadamente mayores. Por ende, una tasa de recirculación ascendente adecuada, en las realizaciones, puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,09 L/s/m² (0,5 L/min/ft²) a aproximadamente 0,9 L/s/m² (5 L/min/ft²). La ultrafiltración y diafiltración se puede lograr, por ejemplo, a presiones transmembrana de aproximadamente 5 a aproximadamente 344,7 kPa (50 p.s.i.). La ultrafiltración y diafiltración se puede lograr, por ejemplo, a presiones transmembrana de aproximadamente 68,9 kPa (10 p.s.i.) a aproximadamente 344,7 kPa (50 p.s.i.). En las realizaciones de la presente invención se provee un proceso para preparar un concentrado de anticuerpos para una formulación de anticuerpos más diluida, teniendo el concentrado de anticuerpos una biocarga mínima, por ejemplo, menor o inferior a un límite detectable, tal como, menor de aproximadamente 100 UFC/mL.

Las composiciones de anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, una preparación de anticuerpos monoclonales concentrada para administración a seres humanos, tales como a una concentración mayor que, o igual a aproximadamente 100 g/L (mg/mL), tal como aproximadamente 120 a aproximadamente 170 g/L.

Las composiciones de anticuerpos de la invención pueden ser, por ejemplo, inmunoglobulinas, tales como del grupo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM; subclases de las mismas; recombinantes de las mismas; fragmentos de las mismas; y mezclas de las mismas de cualquiera de los presentes. Una composición de anticuerpos preferentes de la invención incluye anticuerpos antilgE humanizados recombinantes. Las composiciones de anticuerpos de la invención pueden incluir un buffer. Un buffer preferido puede ser, por ejemplo, una mezcla de cloruro de histidina y cloruro de arginina acuosos.

Los procesos preparativos de la invención se logran preferentemente en el mismo aparato y sin intervención operaria o con mínima intervención operaria, por ejemplo, según se ilustra en la FIG. 1.

La primera preparación de anticuerpos se puede obtener o preparar usando una variedad de métodos químicos, físicos, mecánicos o no mecánicos, o bioquímicos, tales como, molido, ultrasonificación, homogenización, digestión enzimática, extracción con solvente, centrifugación, cromatografía, y métodos similares, y combinaciones de los mismos, véase, por ejemplo, la cita mencionada anteriormente con relación a R. Hatti-Kaul y otros, "Downstream Processing in Biotechnology," en *Basic Biotechnology*, Capítulo 9. La tercera preparación de anticuerpos se puede procesar adicionalmente, si se desea, usando, por ejemplo, nanofiltración (para extraer, por ejemplo, iones divalentes), ósmosis inversa (para extraer, por ejemplo, iones monovalentes), y métodos de purificación líquida similares. La tercera preparación de anticuerpos de la invención se puede envasar, almacenar o usar directamente. La tercera preparación de anticuerpos se puede procesar adicionalmente, si se desea, usando, por ejemplo, pasos de concentración adicionales, tales como secado, liofilización, liofilización / reconstitución, y métodos similares. El producto del tercer anticuerpo concentrado se puede reconstituir en una etapa posterior, si se desea, con un líquido adecuado.

Con relación a las figuras, la FIG. 1 ilustra un aparato, en las realizaciones de la presente invención, para lograr el proceso preparativo que incluye un sistema de ultrafiltración / diafiltración (100) que tiene una unidad de FFT de ultrafiltración-diafiltración (UF-DF) (110), que tiene una membrana de UF-DF (115), que se comunica con el tanque de recirculación (120) que sirve como principal depósito de alimentación y retentado. En las realizaciones, el tanque (120) puede tener un sistema de control de temperatura que comprende, por ejemplo, una camisa de aislamiento (125), un elemento de calefacción de temperatura controlada o termostato (126), tal como un elemento calentador a resistencia en reóstato o un sistema de líquido circulante calentado que incluye un calentador (no ilustrado), un regulador de flujo (127), tal como una bomba de recirculación, y un fluido de transferencia de calor adecuado, tal como ya sea agua, un glicol o mezclas de los mismos. Todos los componentes del circuito interno o los componentes que contribuyen al flujo o procesamiento del circuito interno, tales como tubos, válvulas, bombas, tanques y componentes similares, puede aislarse opcionalmente o adaptarse adicionalmente para el calentamiento

externo para mantener un control cercano de las especificaciones de la temperatura y evitar que se produzcan desviaciones de temperatura en el trayecto del fluido de recirculación dentro y entre la cámara del filtro (110) y el tanque de recirculación (120). En las realizaciones, por ejemplo, cuando el sistema (100) está efectuando la primera ultrafiltración, tal como en una modalidad de alimentación por tandas, el sistema puede incluir un tanque de alimentación opcional (128) que se comunica por fluido con el tanque de alimentación de recirculación (120) y puede usarse para, por ejemplo, completar, rellenar, o suplementar la fase líquida que merma del tanque de recirculación (120).

Una bomba (130) bombea líquido de alimentación del tanque (120) a través de la unidad UF / DF (110) y luego recircula el retentado resultante (la porción no filtrada o excluida de la membrana del líquido de alimentación) al tanque de recirculación (120). Un segundo tanque (140) mantiene y bombea opcionalmente (no ilustrado) un buffer en el circuito principal (110-120 bucle) durante la diafiltración a volumen constante. Por ejemplo, la tasa de adición y el volumen del buffer introducido en el circuito principal se encuentra preferentemente en la misma tasa y volumen a los cuales el filtrado deja el circuito principal a través de la membrana (115). El tanque del buffer (140) se puede aislar opcionalmente con la camisa de aislamiento (143) y puede incluir el equivalente del elemento de calefacción anteriormente mencionado y una bomba de recirculación (no ilustrada). Una fuente de gas inerte opcional (145), tal como nitrógeno, u otras fuentes de gas comprimido se pueden utilizar, por ejemplo, para la recuperación del producto, para presurizar el retorno del retentado, excluir el oxígeno, para agotar líquido, para limpiar, para evaluar la integridad de la membrana, y operaciones similares. Un tercer tanque (160) se usa para recolectar y recuperar el filtrado que sale de la unidad (110). Las válvulas (150, 170) se pueden usar como apropiadas para regular la dirección y, opcionalmente, la tasa de flujo del líquido en el sistema. Todas las válvulas y bombas se pueden activar manualmente, por control de computadora coordinado, o ambas. Un tanque opcional (190) y la corriente saliente pueden ofrecer un drenaje de líquidos de lavado complementario, recuperación del producto, o sistema de monitoreo, por ejemplo, cuando se equipan con un dispositivo de monitoreo opcional (180), tal como un dosificador de densidad óptica, filtro(s) opcional(es) (185) tales como un filtro protector, filtro del producto, y subsistemas opcionales similares. En las realizaciones, el principal circuito de fluido (110-120 bucle) puede estar equipado opcionalmente con un sistema de monitoreo de línea interna.

Las preparaciones de anticuerpos concentradas preparadas por procesos de la presente invención se pueden usar para administración terapéutica en humanos, incluyendo productos de inmunoglobulina, ya sea para administración intramuscular (IMIG) como intravenosa (IVIG). Las preparaciones de anticuerpos concentradas de la invención pueden incluir un estabilizador, por ejemplo, una solución de sal tamponada de aminoácido, azúcares simples, o estabilizadores similares, agentes quelantes de iones adecuados, tales como EDTA o ión citrato, y combinaciones de los mismos, véase, por ejemplo, Wang, Y.-C. J. y otros, "Parenteral formulations of proteins and peptides: stability and stabilizers," *J. Parenteral Sci. Technol.*, 42, Suppl. S3-S26 (1988). El resumen publicado por Derwent de JP01268646A (AN89-359879) manifiesta que la solicitud describe una preparación de inyección de un anticuerpo monoclonal IgG₃ que tiene una concentración de 0,1 microgramos/mL a 100 mg/mL. Se cree que el objeto revelado en estas publicaciones está fuera del alcance de la presente invención.

Las preparaciones de acuerdo con la invención pueden estar sustancialmente libres de agregados. Los niveles aceptables de contaminantes agregados serían menores que, por ejemplo, aproximadamente 5 % en peso, e idealmente menores que 2 % en peso. Los niveles tan bajos como 0,2 % en peso se pueden alcanzar, aunque los contaminantes agregados de aproximadamente 1 % en peso son más comunes. La preparación en las realizaciones, pueden ser también preferentemente libres de excipientes tradicionalmente usados para estabilizar las formulaciones policlonales, por ejemplo, glicina y/o maltosa.

La presente invención puede proveer una preparación de anticuerpos monoclonales para administración en un ser humano caracterizada en que el anticuerpo en la preparación es un anticuerpo recombinante y puede presentarse a una concentración de 100 mg/mL o mayor, preferentemente mayor que 150 mg/mL. La preparación es preferentemente sustancialmente libre de cualquier agregado de proteína.

El pH de las formulaciones farmacéuticas de la invención depende de la ruta particular de administración. No obstante, a fin de maximizar la solubilidad del anticuerpo en la solución concentrada, el pH de la solución debería ser diferente del pH del punto isoelectrico (pI) del anticuerpo.

En las realizaciones de la invención, la preparación monoclonal se puede utilizar para uso en terapia en seres humanos. Se pueden tratar varios trastornos humanos, tales como cáncer o enfermedades infecciosas, por ejemplo, las mencionadas con anterioridad, y la disfunción inmune, tal como los trastornos

relacionados con la célula T, incluyendo vasculitis severa, artritis reumatoidea, lupus sistémico, también trastornos autoinmunes tales como esclerosis múltiple, enfermedad injerto contra huésped, psoriasis, diabetes juvenil, enfermedad de Sjogrens, enfermedad tiroidea, miastenia gravis, rechazo de transplante, enfermedad inflamatoria del intestino, asma, trastornos relacionados con IgE, y otros trastornos o condiciones similares, o combinaciones de los mismos.

Por lo tanto, la invención ofrece en las realizaciones el uso de una preparación de anticuerpos monoclonales concentrada según lo descrito en la presente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquiera de los trastornos citados con anterioridad, o trastornos similares. También se revela un método para tratar un ser humano, que padece de cualquiera de estos desórdenes, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de una preparación de acuerdo con la invención. Los dosajes de dichas preparaciones de anticuerpos varían con las condiciones que se tratan y el receptor del tratamiento pero pueden estar, por ejemplo, en el rango de aproximadamente 50 a aproximadamente 2.000 mg para un paciente adulto, preferentemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 mg administrado por día o por semana durante un período entre 1 y 30 días, y repetirse si es necesario. Las dosis se pueden administrar como dosis simples o múltiples.

Descripción del proceso.

El paso de la formulación típicamente intercambia la sustancia de la droga purificada en su totalidad, por ejemplo, resultante de una cromatografía de intercambio de iones en la concentración y composición de excipientes final. Por lo general, no se alcanzaba la purificación en esta etapa salvo por pequeña extracción de moléculas. El énfasis se ponía en el alto rendimiento, intercambio del buffer y robustez del paso de la formulación. Durante la formulación vía FFT (filtración de flujo tangencial), la solución de alimentación que contenía proteína se bombeó a través del sistema de membrana y de regreso al recipiente de recirculación. La membrana FFT retuvo la proteína (como parte del retentado) mientras que el filtrado (o permeado) se dirigió a través de la membrana por presión. La presión recibe el nombre de presión transmembrana (PTM) y se controla típicamente usando una válvula de control de presión del retentado. El proceso se alcanzó generalmente por una secuencia de una primera ultrafiltración (concentración), diafiltración (intercambio del buffer de volumen constante), y una

segunda ultrafiltración (concentración adicional). El número de diavolumenes (equivalentes volumétricos) necesarios para extraer componentes del buffer del proceso se pueden calcular o determinar experimentalmente de manera sencilla.

Proceso UF/DF generalmente para antilgE.

El pH de un combinado de intercambio de aniones de cromatografía se ajustó a un pH de aproximadamente 6 usando 0,5 M de ácido fosfórico acuoso. El combinado de intercambio de aniones de pH ajustado se formuló por el proceso de ultrafiltración / diafiltración (UF/DF) de la presente invención usando una membrana que tiene un límite nominal molecular de 10.000 – 30.000 Daltons. Previo al procesamiento, la membrana de UF se equilibró con buffer de diafiltración (0,02 M de histidina, 0,2 M arginina - HCl, pH 6).

El producto del intercambio aniónico (combinado de intercambio de aniones) se cargó luego en el sistema y se concentró a una concentración intermedia mediante la primera ultrafiltración. El combinado se diafiltró luego (8 X o diavolumenes) en su formulación (0,02 M histidina, 0,2 M arginina-HCl, pH 6). El combinado se concentró luego mediante una segunda ultrafiltración a una concentración en volumen final de >170g/L y se recuperó a través de un filtro estéril de 0,22 micrómetros. La totalidad del proceso de UF/DF se efectuó a un punto fijo de temperatura de aproximadamente 45 °C. Este control de la temperatura se logró utilizando un control de temperatura del combinado de intercambio de aniones entrante, el buffer de diafiltración y el uso de un recipiente de recirculación recubierto para el proceso de UF/DF de acuerdo con lo ilustrado en la presente.

Después de la UF/DF, el combinado recuperado se diluyó (es decir, acondicionó) a una concentración en volumen de aproximadamente 150 g/L en 0,02 M de histidina, 0,2 M de arginina-HCl, 0,04 % de polisorbato 20, pH 6 (formulación final). Durante los pasos de acondicionamiento se dejó que la temperatura del lote volviera a temperatura ambiente. Después del acondicionamiento, el lote formulado se recuperó nuevamente a través de un filtro estéril de 0,22 micrómetros.

El sistema de UF/DF se puede regenerar con 0,1 N de hidróxido de sodio y se higieniza con 1,4 % de Minncare®. Cuando no se lo utiliza, el sistema se puede almacenar en 0,1 N de hidróxido de sodio acuoso. Las membranas de UF/DF se

22
39

pueden almacenar, por ejemplo, en una solución de 0,1 % de Roccal®/20 % de glicerol-agua entre campañas.

Procedimientos de proceso de ultrafiltración/diafiltración generales

Parámetros de operación: Tasa de flujo de alimentación a 0,09 L/s/m² (0,5 L/min/ft²). Un control de presión de retentado constante (por ejemplo, 68,9 kPa (10 psig)) se utilizó para la equilibración preuso y de limpieza, mientras que para el procesamiento se usó presión de retentado constante C_{pared}, o PTM constante.

Equilibración preuso: las siguientes preparaciones se lograron en membranas de cassette Pellicon-2 limpias previo al uso para asegurar que las membranas estuvieran apropiadamente equilibradas.

<u>Volumen</u> <u>L/m² (L/ft²)</u>	<u>Solución</u> <u>(temperatura</u> <u>ambiente)</u>	<u>Modalidad</u>
-	-	PUFA
10,76 (1.0)	WFI	PUFA
10,76 (1.0)	Buffer de DF	PUFA
5,38 (0.5)	Buffer de DF	TRFO, 10 minutos
-	-	PUFA

Uso del proceso: Se realizó lo siguiente en el combinado de intercambio de aniones resultante (Combinado-Q) obtenido de un paso de separación anterior, por ejemplo, un paso de cromatografía de Q-Sefarosa:

Una primera ultrafiltración (UF1) a una concentración de aproximadamente 5 g/L a una concentración por diafiltración (C_{DF});

Diafiltración (DF1) con cuatro (4) volúmenes de diafiltración (VD) con el buffer de DF;

Diafiltración posterior (DF2) con cuatro (4) volúmenes de diafiltración (VD) del buffer de DF;

Una segunda ultrafiltración (UF2) a una concentración final (C_{Final}); y recuperación opcional del producto.

Dichos pasos se realizaron típicamente a reciclado de dP bajo (mezcla), por ejemplo, 15 minutos.

23
40

Limpieza a fondo post uso: las siguientes secuencias y condiciones tabuladas se usaron para limpiar a fondo en membranas de cassette Pellicon-2 inmediatamente después del uso.

Volumen L/m ² (L/ft ²)	Solución (temperatura ambiente)	Modalidad
10,76 (1.0)	0,1 N NaOH	PUFA
5,38 (0.5)	0,1 N NaOH	TRFO, 30 minutos
-	-	PUFA
10,76 (1.0)	WFI	PUFA
5,38 (0.5)	Minncare [®] 300 ppm	TRFO, 30 minutos
-	-	PUFA
10,76 (1.0)	WFI	PUFA
-	-	Ensayo de integridad a 206,8 kPa (30 psig)
5,38 (0.5)	0,1 N NaOH	TRFO, 15 minutos de almacenamiento

Definiciones para modalidades de operación en FFT.

Pasada única con filtrado abierto (PUFA). El retentado y filtrado se dirigen a un desagüe. Válvula de filtrado abierta.

Reciclado total con filtrado abierto (TRFO). El retentado y filtrado se dirigen a un recipiente de reciclado. Válvula de filtrado abierta.

Ultrafiltración de alimentación en tandas (UF-AT). El retentado se dirige a un tanque de reciclado, el filtrado se dirige al desagüe y el combinado entrante se transfiere al tanque de reciclado.

Ultrafiltración en tandas (UF-T). El retentado se dirige al tanque de reciclado, y el filtrado se dirige al desagüe.

Diafiltración (DF). El retentado se dirige al tanque de reciclado, el filtrado se dirige al desagüe y el buffer de diafiltración se transfiere al tanque de reciclado.

PD se refiere a la presión diferencial.

Transferencia de producto. La unidad de membrana ultrafiltro y el tanque de reciclado se abren al tanque del combinado. La presión de superposición de

nitrógeno está controlada. El combinado se transfiere primero usando la bomba de reciclado y luego usando una bomba peristáltica manual.

Transferencia de alimentación. El combinado entrante se bombea al tanque de reciclado.

Reciclado total con filtrado cerrado (RTFC). El retentado se dirige al recipiente de reciclado. Válvula de filtrado cerrada.

"Combinado-Q" se refiere al combinado ("pool") proteico o combinado de fracciones proteicas originado de, por ejemplo, un paso anterior de cromatografía Q-Sefarosa que ha sido acondicionado con buffer, también referido como "combinado acondicionado".

API se refiere a agua por inyección.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para describir de manera más completa la forma de usar la presente invención, así como también revelar las mejores modalidades contempladas para llevar a cabo varios aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos no sirven de ninguna manera para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino que se presentan con fines ilustrativos.

Ejemplo 1

Formulación de alta concentración de rhuMAb E25

Un sistema piloto de UF en escala se usó para concentrar / formular rhuMAb E25 (un anticuerpo monoclonal humano recombinante con IgE como buscado). Un sistema de ultrafiltración / diafiltración Millipore Pellicon se ensambló con una membrana de componente de celulosa regenerado de 61,4 m² (5,7 sqft), 10.000 Dalton. El sistema consistió de un soporte de membrana, una bomba de alimentación de 6 lóbulos rotatorios modelo Waukeskaw, tubería de recirculación de acero inoxidable de 1,27 cm (½") de 316L, y un recipiente de recirculación. Los indicadores / transmisores de presión (Anderson) se ubicaron en la entrada (ALIMENTACIÓN), salida (RETENTADO) y permeado (FILTRADO) del soporte de membrana. Los dosificadores de flujo (Yokogawa ADMAG) se ubicaron en la entrada (ALIMENTACIÓN) y permeado (FILTRADO) del soporte de membrana. Una válvula reguladora de retención (Mikroseal) se localizó a la salida del soporte de membrana para controlar la presión del retentado y efectuar la presión transmembrana (PTM). Un tanque recubierto de acero inoxidable 316L de 40 litros se usó como recipiente de recirculación. El tanque se montó con un indicador

de nivel, agitador de montaje superior (Lightnin), disruptor de vórtice y válvula inferior (NovAseptic). El control de temperatura se logró mediante el uso de glicol modulado en temperatura alimentado en la camisa de aislamiento del tanque.

Durante esta etapa, la tasa de fluido de alimentación se fijó a una tasa constante de 0,05 L/s (2,85 L/min) ($0,09 \text{ L/s/m}^2$ ($0,5 \text{ L/min/ft}^2$)). Durante todas las operaciones preuso y post uso, el control de presión del retentado se fijó a una constante de 68,9 kPa (10 psig). Durante las operaciones de ultrafiltración y diafiltración, el sistema usó un esquema de control de C_{pared} para controlar el flujo a través de la membrana, véase, por ejemplo, R. van Reis, y otros, "Constant C_{wall} Ultrafiltration Process Control", *J. of Membrane Science*, 130 (1997), 123-140.

Previamente al proceso, la solución de almacenamiento del sistema (0,1N NaOH) se lavó de un solo paso a modo de desagüe, primero con $21,6 \text{ L/m}^2$ (2 L/ft^2) de agua purificada (AP) y luego $10,8 \text{ L/m}^2$ (1 L/ft^2) de buffer de diafiltración (50 mM de Histidina / pH 6,0). Después de los lavados, el sistema se equilibró a recircular $5,4 \text{ L/m}^2$ ($0,5 \text{ L/ft}^2$) de buffer de diafiltración durante 10 minutos. El pH de la solución recirculada se chequeó para confirmar la equilibración. El nivel del tanque se redujo luego a un valor medible mínimo para minimizar la dilución del combinado proteico entrante. Se midió el combinado proteico resultante de un paso de cromatografía de Q-Sefarosa precedente para que fuera de 3,2 g de E25/L y tuvo un volumen de 43,1 L. La proteína estuvo comprendida en una solución de 25 mM TRIS de buffer y aproximadamente 200 mM de NaCl y el pH se ajustó a 6,2. Para comenzar esta etapa, el combinado proteico se transfirió al recipiente de recirculación. En el recipiente, el combinado se agitó mediante el impulsor de montaje superior y la temperatura se mantuvo a temperatura ambiente (20-25 °C).

Durante el proceso, el combinado se concentró en modalidad de UF1 a 50 g de E25/L (aproximadamente 2,8 L). Al comienzo de la diafiltración, el punto fijo de la temperatura del recipiente de recirculación se incrementó a 40 °C. El incremento en la temperatura y el control se afectó al dejar fluir glicol tibio a través de la camisa de aislamiento exterior del tanque. El combinado se diafiltró luego con 8 diavómenes de buffer de diafiltración. La diafiltración se efectuó a un volumen constante, lo cual se logró al combinar la tasa de flujo de la solución tamponada transferida al tanque de recirculación con la tasa de flujo del filtrado extraído del sistema. Al final de la diafiltración, el combinado se concentró adicionalmente en modalidad de UF2. Esta fase se efectuó usando un punto fijo de temperatura elevada de 40 °C. El buscado para esta concentración final fue de

110 g/L. Esto se logró sin necesidad de reducir la tasa de flujo de alimentación. Posteriormente, se efectuó una mezcla en caída a baja presión en donde la bomba de alimentación se controló para mantener la caída de presión de 34,5-68,9 kPa (5-10 psig) a través del canal de alimentación. Se extrajo una muestra del tanque de recirculación y se midió una concentración en volumen final de aproximadamente 120 g/L. La tabla 1 resume los resultados de flujo y rendimiento de UF1, DF (DF1+DF2) y UF2.

Tabla 1.

Fase de proceso	Rendimiento normalizado g/m²/s (g/ft²/hr)	Flujo normalizado LMH/kPa (LMH/psig)
UF1	0,04 (13.8)	6,89 (4.97)
DF	0,04 (13.8)	0,42 (2.92)
UF2	0,54 (181.4)	0,24 (1.64)

La FIG. 2 muestra los valores de proceso observados o medidos en el tiempo para los parámetros de la tasa de flujo de alimentación (210), temperatura de tanque (220), dP alimentado (230), PTM (240), y tasa de flujo de filtrado (250) durante las varias fases o modalidades del proceso, incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30).

La FIG. 3 muestra los valores del proceso observados o medidos en el tiempo para la concentración de E25 (310), flujo (320) y PTM (240).

La FIG. 4 muestra los valores del proceso observados o medidos en el tiempo para la caída de presión en comparación con la concentración proteica observada para UF1 (410) y UF2 (420) a 37 °C.

El combinado proteico se recuperó mediante una serie de pasos. En primer lugar, el combinado en el tanque de recirculación se bombeó al tanque a través de un filtro de grado esterilizante de 0,22 micrones Millipac 200, usando la bomba de alimentación de lóbulos rotatorios. Luego, la solución proteica se desplazó de la unidad de membrana y tubería con una purga de gas nitrógeno de 34,5 kPa (5 psig) aplicado al punto máximo en la línea del retentado. La fase final comprendió una purga del tanque y línea de alimentación, también utilizando el gas nitrógeno de 34,5 kPa (5 psig).

Se cree que la recuperación del producto mejoró en comparación con el Ejemplo 1 cuando se realizó a temperatura ambiente porque la temperatura elevada usada en uno o más de los pasos de ultrafiltración, diafiltración o recuperación redujo efectos viscosos. Por ejemplo, cuando se apagó el control de temperatura durante la recuperación del producto, el sistema se enfrió lentamente durante esta operación causando dificultades para la recuperación desde la unidad de membrana. En forma alternativa, la recuperación se pudo realizar primero desde el soporte de membrana y luego desde el recipiente de recirculación.

Para determinar la masa de pérdida durante la recuperación, se agregó 1,74 L del buffer de DF al sistema y se recirculó durante aproximadamente 5 minutos y se recuperó usando la misma secuencia que la descrita anteriormente. Este volumen se analizó luego en cuanto a la concentración proteica con otros combinados. La Tabla 2 resume los resultados.

Tabla 2.

	Volumen (L)	Concentración (g/L)	Masa (g)	Rendimiento o {Pérdida} (%)
Combinado-Q	43,1	3,2	137,9	100
Combinado recuperado	0,99	120	118,8	86,1
Lavado de buffer	1,74	9,8	17,1	12,4
Filtrado	65,3	0,04	2,6	1,9

Luego del procesamiento, la membrana se regeneró usando un lavado único de 0,1N de NaOH de 10,8 L/m² (1 L/ft²), seguido de 5,4 L/m² (0,5 L/ft²) de recirculación total durante 30 minutos. Esto fue seguido de 10,8 L/m² (1 L/ft²) de lavado con agua purificada (AP). Esto fue seguido de una recirculación total de 300 ppm de solución Minncare[®] durante 30 minutos. El sistema se lavó nuevamente con 10,8 L/m² (1 L/ft²) de agua purificada y finalmente se recirculó durante 15 minutos con 0,1N de NaOH y se almacenó. El combinado recuperado se diluyó en 80 g de E25/L y se acondicionó en la formulación final de 50 mM de

histidina / 150 mM de trealosa / 0,02 % de polisorbato 20 / pH 6,0. La calidad del producto se evaluó por cromatografía de exclusión de tamaño (CET) tanto para el Combinado-Q entrante como para el lote recuperado final. Estos datos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3.

Combinado	Resultados de CET (% de monómero)
Combinado-Q	99,8
Lote final	99,8

Ejemplo comparativo 2

Formulación de alta concentración de rhuMAb E25 a temperatura ambiente

Se realizó el Ejemplo 1 con las siguientes excepciones. Previo al proceso, la solución de almacenamiento del sistema (0,1N de NaOH) se lavó en paso simple a modo desagüe primero con 21,6 L/m² (2 L/ft²) de agua purificada (AP) y luego con 10,8 L/m² (1 L/ft²) del buffer de diafiltración (20 mM de histidina / pH 6,0). Luego de los lavados el sistema se equilibró al recircular 5,4 L/m² (0,5 L/ft²) del buffer de diafiltración durante 10 minutos. Se chequeó el pH de la solución recirculada para confirmar la equilibración. El nivel en el tanque se redujo luego a un valor medible mínimo para minimizar la dilución del combinado proteico entrante.

Se midió el combinado proteico del paso de cromatografía de Q-Sefarosa anterior para que fuera de 3,3 g de E25/L y tuvo un volumen de 33,3 L. La proteína estuvo comprendida en una solución de 25 mM TRIS de buffer y aproximadamente 200 mM de NaCl y el pH se ajustó a 6,2. Para comenzar la etapa, el combinado proteico se transfirió al recipiente de recirculación. En el recipiente, el combinado se agitó mediante el impulsor de montaje superior y la temperatura se mantuvo a temperatura ambiente (20-25 °C). Durante el proceso, el combinado se concentró a modalidad UF1 a 50 g de E25/L (aproximadamente 2,2 L). El combinado se diafiltró luego con 8 diavolúmenes de buffer de diafiltración. La diafiltración se efectuó a volumen constante, dicho volumen se alcanzó al combinar la tasa de flujo del buffer transferido al tanque de recirculación con la tasa de flujo del filtrado extraído del sistema. La diafiltración se efectuó

también a temperatura ambiente. Al final de la diafiltración, el combinado se concentró luego en modalidad de UF2. El buscado para esta concentración final fue de 110 g/L. Sin embargo, a raíz de la caída de presión alta a través del canal de alimentación, esta concentración no se pudo lograr. En un intento de lograr esta concentración, se redujo la tasa de flujo de alimentación a 0,02 L/s (1,4 L/min) a una concentración en volumen de aproximadamente 80 g de E25/L porque la caída de presión a través del canal de alimentación había alcanzado 344,7 kPa (50 psig). La UF2 continuó hasta que se alcanzó nuevamente una caída de alta presión de 344,7 kPa (50 psig) y el proceso se detuvo. A continuación, se efectuó una mezcla con caída a baja presión donde se usó la bomba de alimentación para mantener una caída de presión de 34,5 kPa (5 psig) a través del canal de alimentación. Nuevamente, la naturaleza viscosa de la solución proteica dificultó el logro ya que la bomba de lóbulos rotatorios alcanzó presiones excesivas. Se extrajo una muestra del tanque de recirculación y se midió una concentración en volumen final de aproximadamente 104 g/L. La Tabla 4 resume el rendimiento y el flujo medidos durante las fases UF1, DF (DF1+DF2) y UF2.

Tabla 4.

Fase de proceso	Rendimiento normalizado g/m²/s (g/ft²/hr)	Flujo normalizado LMH/kPa (LMH/psig)
UF1	0,04 (14,5)	0,77 (5,31)
DF	0,03 (9,5)	0,21 (1,47)
UF2	0,43 (144,6)	0,11 (0,78)

La FIG. 5 muestra los valores del proceso observados y medidos en el tiempo para los parámetros de la tasa de flujo de alimentación (210), temperatura del tanque (220), dP alimentado (230), PTM (240), y tasa de flujo filtrado (250) durante las varias fases o modalidades del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20) y UF2 (30).

La FIG. 6 muestra los valores de proceso observados o medidos en el tiempo para la concentración de E25 (310), flujo (320) y PTM (240).

30
47

La FIG. 7 muestra los valores de proceso observados o medidos en el tiempo para la caída de presión comparada con la concentración proteica observados para UF1 (410) y UF2 (420) a 24 °C.

El combinado proteico se recuperó por pasos. En primer lugar, el combinado en el tanque de recirculación se bombeó desde el tanque a través de un filtro de grado esterilizante de 0,22 micrones Millipac 200 usando la bomba de alimentación de lóbulos rotatorios. A continuación, la solución proteica se desplazó desde la unidad de membrana y tubería con una purga de gas nitrógeno a 34,5 kPa (5 psig) aplicado al punto máximo en la línea del retentado. La recuperación del producto de esta manera fue muy pobre debido a la naturaleza viscosa de la solución. La fase final fue una purga del tanque y línea de alimentación, usando también el gas nitrógeno a 34,5 kPa (5 psig).

Para determinar la masa de pérdida durante la recuperación, se agregó 1,85 L de buffer DF al sistema y se recirculó durante aproximadamente 5 minutos y se recuperó usando la secuencia del Ejemplo 1. Este volumen se analizó luego por su concentración proteica con los otros combinados. La Tabla 5 resume los resultados.

Tabla 5.

	Volumen (L)	Concentración (g/L)	Masa (g)	Rendimiento o {Pérdida} (%)
Combinado -Q	33,3	3,3	109,9	100
Combinado recuperado	0,77	104,4	80,4	73,1
Lavado de buffer	1,85	14,7	27,2	24,7
Filtrado	52,2	0,03	1,6	1,5

Después del proceso, la membrana se regeneró usando un único lavado de 0,1 N de NaOH de 10,8 L/m² (1 L/ft²) seguido de 5,4 L/m² (0,5 L/ft²) de recirculación total durante de 30 minutos. Esto fue seguido de un lavado de 10,8 L/m² (1 L/ft²) con agua purificada. Esto fue seguido de una recirculación total de solución de 300 ppm de Minncare[®] durante 30 minutos. El sistema se lavó

31
43

nuevamente con 10,8 L/m² (1 L/ft²) de agua purificada y finalmente se recirculó durante 15 minutos con 0,1 N de NaOH y se almacenó. El combinado recuperado se diluyó a 80 g de E25/L y se acondicionó en la formulación final de 20 mM de histidina / 250 mM de sacarosa / 0,02 % de polisorbato 20 / pH 6,0. La calidad del producto se evaluó por cromatografía de exclusión de tamaño (CET) tanto para el Combinado-Q entrante como para el lote final recuperado. Esta información se resume en la Tabla 6.

Tabla 6.

Combinado	Resultados de CET (% de monómero)
Combinado-Q	99,8
Lote final	99,8

Ejemplo 3

Formulación de alta concentración de rhuMAb E26 con modalidad por tandas de alimentación inicial

El Ejemplo 1 se repitió con las siguientes excepciones. El concentrado / fórmula fue rhuMAb de E26 (un anticuerpo monoclonal humano recombinante tiene como buscado IgE). Los productos de este ejemplo se usaron en la evaluación toxicológica. El sistema de ultrafiltración / diafiltración de Millipore Pelicon se ensambló con una membrana de componente de celulosa regenerada de 1,06 m² (11.4-sqft), 30.000 Dalton. La tasa de flujo de alimentación se fijó a una tasa constante de 0,08 L/s (5,0 L/min) (0,08 L/s/m² (0,44 L/min/ft²)). Durante las operaciones de ultrafiltración y diafiltración la presión del retentado se mantuvo entre aproximadamente 41,4-55,2 kPa (6-8 psig). Se midió el combinado proteico resultante del paso de cromatografía de Q-Sefarosa precedente para que alcanzara 6,7 g de E26/L y tuvo un volumen de 59,3 L.

Como el combinado entrante era más grande que el recipiente de recirculación, el proceso de UF1 comenzó en modalidad de alimentación por tandas. En esta modalidad, el Combinado-Q se agregó al recipiente de recirculación a aproximadamente la misma tasa a la cual el filtrado pasa a través de la membrana FFT al desagüe. Después de que el Combinado-Q restante se había transferido al recipiente de recirculación, el proceso de la UF1 continuó en modalidad por tandas. Durante la UF1 el combinado se concentró a 50 g de E26/L

(aproximadamente 7,9 L). Al comienzo de la diafiltración, el punto fijo de la temperatura del recipiente de recirculación se incrementó a 40 °C. El incremento en la temperatura y en el control se afectó al dejar fluir glicol tibio a través de la camisa de aislamiento exterior del tanque. El combinado se diafiltró luego con 8 diavolumenes del buffer de diafiltración. La diafiltración se efectuó a un volumen constante al combinar la tasa de flujo de un buffer transferido al tanque de recirculación con la tasa de flujo del filtrado extraído del sistema. Al final de la diafiltración, el combinado se concentró adicionalmente en modalidad de UF2 a una concentración final de 109 g de E26/L (3,6L). Esta fase se efectuó también usando un punto fijo de temperatura elevada de 40 °C. A continuación, se efectuó una mezcla con caída a baja presión donde la bomba de alimentación se controló para mantener una caída de presión de kPa (5-10 psig) a través del canal de alimentación. La tabla 7 resume los resultados de rendimiento y flujo de UF1, DF (DF1+DF2) y UF2.

Tabla 7.

Fase de proceso	Rendimiento normalizado g/m²/s (g/ft²/hr)	Flujo normalizado LMH/kPa (LMH/psig)
UF1	0,08 (26,1)	0,54 (3,71)
DF	0,06 (19,2)	0,34 (2,34)
UF2	0,52 (174,2)	0,26 (1,80)

La FIG. 8 muestra los valores observados o medidos en el tiempo para la tasa de flujo de alimentación (210), temperatura de tanque (220), dP alimentado (230), PTM (240) y tasa de flujo de filtrado (250).

La FIG. 9 muestra los valores observados o medidos en el tiempo para la concentración de E26 (910), flujo (920), y PTM (940).

La FIG. 10 muestra los valores observados o medidos en el tiempo para la caída de presión comparada con la concentración proteica observada para UF1 (1010) y UF2 (1020).

Justo antes de la recuperación del producto, una muestra de 10 mL se analizó para detección y tipificación de biocarga. Un límite de rechazo típico es 1.000 de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Los resultados de esta evaluación fueron 1,8 de UFC/mL, un valor adecuado en este paso y bien por

debajo del límite de rechazo. Para determinar la masa de pérdida durante la recuperación, se agregó 908,1 mL de buffer de DF al sistema y se recirculó durante aproximadamente 5 minutos y se recuperó usando la misma secuencia descrita con anterioridad. Este volumen se analizó luego para la concentración proteica con otros combinados. La tabla 8 resume los resultados.

Tabla 8.

	Volumen (L)	Concentración (g/L)	Masa (g)	Rendimiento {Pérdida} (%)
Combinado-Q	59,3	6,7	397,3	100
Combinado recuperado	3,41	109,1	372,0	93,6
Lavado de Buffer	0,908	20,4	18,5	4,7
Filtrado	120	n/d	n/d	n/d

El combinado recuperado se diluyó a 80 g de E26/L y se acondicionó en la formulación final de 50 mM de histidina / 150 mM de trealosa / 0,02 % de polisorbato 20 / pH 6,0. La calidad del producto se evaluó por cromatografía de exclusión de tamaño (CET) para el Combinado-Q entrante, el combinado de retentado después de la UF1, el combinado del retentado después de la DF, y lote recuperado final. Estos datos se resumieron en la Tabla 9.

Tabla 9.

Combinado	Resultados CET (% monómero)
Combinado-Q	99,8
Fin de la UF1	99,8
Fin de la DF	99,8
Lote final	99,8

Ejemplo 4

Formulación de alta concentración de rhuMAb E26 para Comparación-Evaluación Toxicológica de 10kD y 30kD

Se repitió el Ejemplo 3 con las siguientes excepciones. Dos sistemas piloto de UF en escala se usaron para concentrar/formular rhuMAb E26. Dos sistemas de Ultrafiltración / Diafiltración Millipore Pelicon se ensamblaron con una membrana de componente de celulosa regenerada de 1,06 m² (11.4-sqft), una con un tamaño de poro de 10.000 Dalton y la otra con un tamaño de poro de 30.000 Dalton. Las presiones del retentado se mantuvieron a aproximadamente 41,4-62,1 kPa (6-9 psig).

Proceso 10 kD

Se midió el combinado proteico resultante del paso de cromatografía de Q-Sefarosa precedente para que fuera de 5,85 g de E26/L y tuvo un volumen de 62,4 L. Durante la UF1, el combinado se concentró a 50 g de E26/L (aproximadamente 7,3 L). Al final de la diafiltración, el combinado se concentró adicionalmente a modalidad de UF2 a una concentración final de 107,5 g de E26/L (3,4 L). La Tabla 10 resume los resultados de rendimiento y flujo de UF1, DF y UF2.

Tabla 10.

Fase de proceso	Rendimiento normalizado g/m²/s (g/ft²/hr)	Flujo normalizado LMH/kPa (LMH/psig)
UF1	0,07 (21,8)	0,52 (3,6)
DF	0,05 (15,9)	0,38 (2,6)
UF2	0,41 (137,4)	0,28 (1,93)

Para determinar la masa de pérdida durante la recuperación, se agregó 987 mL de buffer DF al sistema y se recirculó durante aproximadamente 5 minutos y se recuperó usando la misma secuencia descrita con anterioridad. Este volumen se analizó luego para la concentración proteica con otros combinados. La Tabla 11 resume los resultados.

Tabla 11.

	Volumen (L)	Concentración (g/L)	Masa (g)	Rendimiento o {pérdida} (%)

Combinado-Q	62,4	5,85	365,4	100
Combinado recuperado	3,38	107,5	361,7	98,9
Lavado de Buffer	0,987	19,9	19,6	5,4
Filtrado	125	n/d	n/d	n/d

La FIG. 11 muestra los valores del proceso medidos u observados en el tiempo para la tasa de flujo de alimentación (210), temperatura del tanque (220), dP alimentado (230), PTM (240) y tasa de flujo filtrado (250), en las modalidades o fases varias del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30) y dP bajo (40), para el proceso de 10 kD.

La FIG. 12 muestra los valores del proceso observados o medidos en el tiempo para la concentración de E26 (1210), flujo (1220) y PTM (1240), en las modalidades o fases varias del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30) y dP bajo (40), para el proceso de 10 kD.

FIG. 13 muestra los valores del proceso observados o medidos en el tiempo para la caída de la presión comparada la concentración proteica observada para la UF1 (1310) y UF2 (1320), para el proceso de 10 kD.

Proceso 30 kD

El combinado proteico resultante del paso de cromatografía de Q-Sefarosa precedente se midió para ser de 5,85 g de E26/L y tuvo un volumen de 64,5 L. Durante la UF1 el combinado inicial se concentró a 50 g de E26/L (aproximadamente 7,5 L). Al final de la diafiltración, el combinado se concentró adicionalmente a modalidad de UF2 a una concentración final de 117,5 g de E26/L (3,2 L). La Tabla 12 resume los resultados de rendimiento y flujo de UF1, DF y UF2.

Tabla 12.

Fase de proceso	Rendimiento normalizado g/m²/s (g/ft²/hr)	Flujo normalizado LMH/kPa (LMH/psig)
UF1	0,08 (25,5)	0,58 (4,01)
DF	0,05 (17,6)	0,35 (2,39)

26
53

UF2	0,54 (180,5)	0,15 (1,57)
-----	--------------	-------------

Para determinar la masa de pérdida durante la recuperación, se agregó 918 mL de buffer DF al sistema y se recirculó durante aproximadamente 5 minutos y se recuperó usando la misma secuencia descrita anteriormente. El combinado recuperado se diluyó a 80 g de E26/L y se acondicionó en la formulación final de 50 mM de histidina / 150 mM de trealosa / 0,02 % de polisorbato 20 / pH 6,0. La Tabla 13 resume los resultados.

Tabla 13.

	Volumen (L)	Concentración (g/L)	Masa (g)	Rendimiento o {Pérdida} (%)
Combinado-Q	64,5	5,85	377,3	100
Combinado recuperado	3,20	117,5	376,0	99,6
Lavado de Buffer	0,918	22,7	20,8	5,5
Filtrado	125	n/d	n/d	n/d

La FIG. 14 muestra los valores del proceso observados o medidos en el tiempo para la tasa de flujo de alimentación (210), temperatura de tanque (220), dP alimentado (230), PTM (240) y tasa de flujo filtrado (250), en las varias fases o modalidades del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30) y dP bajo (40), para el proceso 30 kD.

La FIG. 15 muestra los valores del proceso observados o medidos en el tiempo para la concentración de E26 (1510), flujo (1520) y PTM (1540), en las varias fases o modalidades del proceso incluyendo UF1 (10), DF (20), UF2 (30) y dP bajo (40), por el proceso 30 kD.

La FIG. 16 muestra los valores del proceso observados o medidos en el tiempo para la caída de presión comparada con la concentración proteica observada para la UF1 (1610) y UF2 (1620), para el proceso 30 kD.

Ejemplo 5

Escala líquida de rhuMAb E25

Se repitió el Ejemplo 1 con las siguientes excepciones.

Un sistema de producción de UF en escala se usó para concentrar / formular un rhuMAb E25 líquido (un anticuerpo monoclonal humano recombinante que tiene IgE como buscado). El producto se puede usar en ensayos de bioequivalencia humana y aplicación terapéutica. Los sistemas de Ultrafiltración / Diafiltración Millipore Pelicon se ensamblaron con una membrana de componente de celulosa regenerada de 21,0 m² (226-sqft), con un tamaño de poro de 30.000 Dalton. Cada sistema consistió de un soporte de membrana, una bomba de alimentación de lóbulo rotatorio Viking S3S, tubería de recirculación de acero inoxidable 316L de 3,81 cm (1½") y un recipiente de recirculación de 250 L.

Se usó un tanque recubierto de acero inoxidable 316L de 250 litros para como recipiente de recirculación. El control de la temperatura de este tanque se logró con un glicol modulado en temperatura alimentado a la camisa de aislamiento del tanque. La temperatura del glicol alimentado a la camisa de aislamiento del tanque se elevó o se disminuyó usando ya sea intercambiador de calor alimentado a vapor o bien un suministro de glicol frío, respectivamente.

Para esta etapa, la tasa de flujo de alimentación se estableció a una tasa constante de 1,9 L/s (114 L/min) (0,09 L/s/m² (0,5 L/min/ft²). El buffer de diafiltración (20 mM de histidina / 200 mM de cloruro de arginina / pH 6,0) se preparó en un tanque separado. La temperatura de este buffer se fijó a 45 °C previo al proceso. Esto permitió un control certero de la temperatura en todo el proceso.

Previo al procesamiento, la solución de almacenamiento del sistema (0,1 N de NaOH) se lavó un solo paso a modo desagüe con 10,8 L/m² (1 L/ft²) de agua para inyección (API) y luego con 10,8 L/m² (1 L/ft²) de buffer de diafiltración. Después de los lavados, el sistema se equilibró al recircular 5,4 L/m² (0,5 L/ft²) de buffer de diafiltración durante 10 minutos. Se chequeó el pH de la solución recirculada para confirmar la equilibración.

Se midió el combinado proteico resultante del paso de cromatografía de Q-Sefarosa precedente hasta alcanzar 5,2562 g de E25/L y tuvo un volumen de 1,141 L. La proteína fue comprendida en una solución de 25 mM TRIS de buffer y aproximadamente 200 mM de NaCl y el pH se ajustó a 6,2. Justo antes de esta etapa, el punto fijo de la temperatura de este combinado se reguló en 45 °C. Para comenzar la etapa, el combinado proteico se transfirió al recipiente de recirculación, a través de un filtro de grado esterilizante de 0,22 micrones a un

nivel de aproximadamente 200 L en el tanque. En el recipiente, el combinado se agitó mediante un impulsor de montaje superior y la temperatura se mantuvo a aproximadamente (40-50 °C). Como el combinado entrante era mayor que el recipiente de recirculación, el proceso de UF1 comenzó en modo de alimentación por tandas. En este modo, el Combinado-Q se agregó al recipiente de recirculación a aproximadamente la misma tasa a la que el filtrado pasa a través de la membrana FFT al desagüe. Después de que el Combinado-Q restante se transfirió al recipiente recirculación, el proceso de UF2 continuó en modo por tandas. Durante la modalidad de UF1 el combinado se concentró a aproximadamente 30 g de E25/L (aproximadamente 200 L). El combinado se diafiltró luego con aproximadamente 8 diavolúmenes de buffer de diafiltración. Durante la diafiltración se mantuvo la temperatura entre 40° y 50 °C. La diafiltración se efectuó a un volumen constante, lo que se logró al combinar la tasa de flujo del buffer transferido al tanque de recirculación con la tasa de flujo del filtrado extraído del sistema. Al término de la diafiltración, el combinado se concentró adicionalmente en modalidad de UF2 a un punto fijo de concentración final de >170 g de E25/L (35 L). Esta fase de modalidad de UF2 se efectuó también a un punto fijo de temperatura elevada de 45 °C +/- 5 °C. Posteriormente, se efectuó una mezcla con caída a baja presión en donde la bomba de alimentación fue controlada para mantener una caída de presión de 34,5-68,9 kPa (5-10 psig) a través del canal de alimentación. Se tomó una muestra y se efectuó un escaneado para confirmar la concentración previa a la recuperación. La concentración de esta muestra fue de 219 g de E25/L. La tabla 14 resume el rendimiento y el flujo medidos durante las fases de UF1, DF (DF1+DF2) y UF2.

Tabla 14.

Fase de proceso	Rendimiento Normalizado g/m ² /s (g/ft ² /hr)	Flujo normalizado LMH/kPa (LMH/psig)
UF1	0,13 (43.8)	0,48 (3.34)
DF	0,08 (25.9)	0,36 (2.46)
UF2	0,24 (78.9)	0,10 (0.66)

38
56

Justo antes de la recuperación del producto, se tomó una muestra de 30 mL y se entregó para detección y tipificación de biocarga. El resultado fue de <0,13 de UFC/mL. El combinado proteico se recuperó mediante una serie de pasos. En primer lugar, el producto se desplazó desde la membrana en una modalidad de paso simple usando 5 L del buffer de DF agregado a la línea del retentado. El producto se filtró en un tanque de recuperación a través de un filtro protector de grado esterilizante de 0,69 m² (7.4 ft²) de 0,22 micrones seguido de un filtro final de grado esterilizante de 0,19 m² (2 ft²) de 0,22 micrones. El combinado en el tanque de recirculación se bombeó luego desde el tanque usando la bomba de alimentación de lóbulo rotatorio. Posteriormente, la solución proteica residual se desplazó desde el tanque y línea de alimentación con una purga de gas nitrógeno de 34,5 kPa (5 psig). La fase final fue una purga de la unidad de membrana, que contenía en su mayor parte buffer de DF del desplazamiento de producto inicial. Esta fase también usó gas nitrógeno a 34,5 kPa (5 psig) aplicado al punto máximo de la línea del retentado. El combinado recuperado fue diluida primero a aproximadamente 153 g de E25/L usando buffer de DF. Finalmente, el combinado se acondicionó en la formulación final de 20 mM de histidina / 200 mM de arginina-HCl / 0,04 % de polisorbato 20 / pH 6,0. Los volúmenes del combinado recuperado, combinado diluido y combinado acondicionado (Combinado-Q), se analizaron uno por uno para la concentración proteica. La Tabla 15 resume los resultados.

Tabla 15.

	Volumen (L)	Concentración (g/L)	Masa (g)	Rendimiento o {pérdida} (%)
Combinado-Q	1.141	5,2562	5.997.3	100
Combinado recuperado	35,0	170,0	5.950,0	99,2
Combinado diluido	39,0	147,0	5.726	95,5

La FIG. 17 muestra los parámetros de la tasa de flujo de alimentación (210), temperatura del tanque (220), dP alimentado (230), PTM (240) y tasa de

flujo del filtrado (250), durante las varias fases o modalidades del proceso incluyendo UF1 (10), DF1 (20), DF2 (25), UF2 (30) y bajo dP (50).

Ejemplo 6

Preparación líquida de rhuMAb E25

El Ejemplo 5 se repitió con las siguientes excepciones. Un sistema de UF en escala de producción se usó para concentrar / formular rhuMAb de E25 líquido (un anticuerpo monoclonal humano recombinante de E25 que tiene como buscado IgE). Los sistemas de Ultrafiltración / Diafiltración de Millipore Pelicon se ensamblaron con una membrana de componente de celulosa regenerada de 21,0 m² (226 sqft), con un tamaño de poro de 30.000 Dalton. Cada sistema consistió de un soporte de membrana, bomba de alimentación de lóbulo rotatorio Viking S3S, tubería de recirculación de acero inoxidable 316L de 3,81 cm (1½”), y un recipiente de recirculación de 250 L. Se usó un tanque recubierto de acero inoxidable 316L de 250 litros como recipiente de recirculación. La tasa de flujo de alimentación se fijó a una tasa constante de 1,9 L/s (114 L/min) (0,09 L/s/m² (0,5 L/min/ft²)). Durante todas las operaciones preuso y post uso, se fijó el control de presión del retentado a una constante de 68,9 kPa (10 psig). Durante las operaciones de ultrafiltración y diafiltración, el sistema usó el esquema de control de C_{pared} para controlar el flujo a través de la membrana. El buffer de diafiltración (20 mM de Histidina / 200 mM de cloruro de arginina / pH 6,0) se preparó en un tanque separado. La temperatura del buffer se fijó a 45 °C previo al proceso. Esto permitió el control certero de la temperatura a través de todo el proceso. El combinado proteico resultante del paso de cromatografía Q-Sefarosa precedente se midió para ser de 5,5438 g de E25/L y tuvo un volumen de 1.082 L. La proteína estuvo comprendida en una solución de 25 mM TRIS de buffer y aproximadamente 200 mM de NaCl y el pH se ajustó a 6,2. Justo antes de esta etapa, el punto fijo de la temperatura de este combinado se reguló en 45 °C. Para comenzar la etapa, el combinado proteico se transfirió al recipiente de recirculación, a través de un filtro de grado esterilizante de 0,22 micrones a un nivel de aproximadamente 200 L en el tanque. En el recipiente se agitó el combinado mediante un impulsor de montaje superior y la temperatura se mantuvo a temperatura ambiente (40-50 °C). Como el combinado entrante era mayor que el recipiente de recirculación, el proceso de UF1 comenzó en modo de alimentación por tandas. En este modo, se agregó el Combinado-Q al recipiente de recirculación a aproximadamente la misma tasa a la cual el filtrado atraviesa la membrana FFT hacia el desagüe. Después de que el

4/58

Combinado-Q restante se transfirió al recipiente de recirculación, el proceso de UF1 continuó en modo por tandas. Durante la UF1 el combinado se concentró a aproximadamente 30 g de E25/L (aproximadamente 200 L). El combinado se diafiltró luego con 8 diavolúmenes de buffer de diafiltración. Durante la diafiltración, la temperatura se mantuvo a temperatura ambiente entre 40 y 50 °C. La diafiltración se efectuó a un volumen constante, lo cual se logró al combinar la tasa de flujo del buffer transferido al tanque de recirculación con la tasa de flujo del filtrado extraído del sistema. Al término de la diafiltración, el combinado se concentró adicionalmente en el modo de la UF2 a un punto fijo de concentración final mayor que 170 g de E25/L (35 L). Esta fase se efectuó también a un punto fijo de temperatura elevada de 45 °C +/- 5 °C. A continuación, se efectuó una mezcla con caída a baja presión donde la bomba de alimentación fue controlada para mantener una caída de presión de 34,5-68,9 kPa (5-10 psig) a través del canal de alimentación. Se tomó una muestra y se efectuó un barrido (escaneado) para confirmar la concentración previamente a la recuperación. La concentración de esta muestra fue de 191 g de E25/L y el volumen del combinado fue de 31,9 L. Un gráfico de los parámetros del proceso en el tiempo fue comparable al observado y resumido para la FIG. 17. La tabla 16 resume el rendimiento y el flujo medidos durante las fases de UF1, DF (DF1+DF2) y UF2.

Tabla 16.

Fase de proceso	Rendimiento normalizado g/m ² /s (g/ft ² /hr)	Flujo normalizado LMH/kPa (LMH/psig)
UF1	0,13 (45,1)	0,47 (3,21)
DF	0,08 (25,9)	0,36 (2,51)
UF2	0,36 (121,4)	0,11 (0,79)

Justo antes de la recuperación del producto, se tomó una muestra de 30 mL y se analizó para la tipificación de biocarga. Los resultados de esta prueba fueron inferiores al límite de detección (< 0,13 de UFC/mL).

El combinado proteico se recuperó mediante una serie de pasos. En primer lugar, el producto se desplazó desde la membrana en un paso simple usando 5 L de buffer de DF agregado a la línea del retentado. El producto fue filtrado en un

tanque de recuperación a través de un filtro protector de grado esterilizante de 0,69 m² (7.4 ft²), de 0,22 micrones seguido de un filtro final de grado esterilizante de 0,19 m² (2 ft²), de 0,22 micrones. El combinado en el tanque de recirculación se bombeó luego desde el tanque usando la bomba de alimentación de lóbulo rotatorio. Posteriormente, la solución proteica residual se desplazó desde el tanque y línea de alimentación con una purga de gas nitrógeno a 34,5 kPa (5 psig). La fase final comprendió una purga en la unidad de membrana, que contenía en su mayor parte buffer de DF del desplazamiento del producto inicial. Esta fase usó también gas nitrógeno a 34,5 kPa (5 psig) aplicado al punto máximo de la línea del retentado. El combinado recuperado se diluyó en primer lugar a aproximadamente 153 g de E25/L usando buffer de DF. Finalmente, el combinado se acondicionó en la formulación final de 20 mM de histidina / 200 mM de arginina-HCl / 0,04 % de polisorbato 20 / pH 6,0. Los volúmenes del combinado recuperado, combinado diluido y combinado acondicionado, se analizaron luego por concentración de la proteína. La Tabla 17 resume los resultados. Después del proceso, la membrana se regeneró según lo descrito con anterioridad.

Tabla 17.

	Volumen (L)	Concentración (g/L)	Masa (g)	Rendimiento o {Pérdida} (%)
Combinado-Q	1.082	5,5438	5.998,4	100
Combinado recuperado	34,95	167,08	5.839,8	97,4
Combinado diluido	38,2	152,14	5.810,3	96,7

Ejemplo 7

Efecto de la temperatura elevada en la calidad del producto

Se guardaron muestras de E25 a 30 g/L y 150 g/L en histidina y buffers de Q a varias temperaturas durante 24 horas. Se tomaron muestras para mediciones de turbidez y ensayos de CET. Los resultados de la turbidez en comparación con la temperatura para E25 a 30 g/L en buffer de Q se muestran en la FIG. 18. La FIG. 19 muestra la cantidad de agregado soluble de E25 (150 g/L en 50mM de

buffer de histidina, pH 6,0) observados en el tiempo y a temperaturas de 23 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C. Los intervalos de cuatro tiempos (tiempo de 0 hora, 4 horas, 7,5 horas y 24 horas) para cada una de estas temperaturas se muestra como un grupo de cuatro barras de izquierda a derecha como 1810 y 1910, en las FIGS. 18 y 19. La turbidez de la solución permaneció esencialmente inalterada después de las 24 horas a 60 °C. No se observó ningún agregado soluble significativo de E25 inferior a los 70 °C, lo que sugirió que las muestras del producto fueron sustancialmente estables hasta al menos 60 °C y al menos 24 horas.

Ejemplo 8

Efecto de la temperatura elevada en la biocarga

Se inocularon muestras de E25 a 30 g/L tanto en buffers de arginina e histidina con 10^3 de unidades formadoras de colonia por mL para dos organismos de estudio: una cepa Gram positivo (*Staphylococcus aureus*); y una cepa Gram negativo (*Pseudomonas chlororaphis*). Las muestras se tomaron luego de 1,5 horas y 6 horas. Los resultados mostrados en los gráficos de barras de las FIGS. 20 y 21 indican que ambos organismos en estudio disminuyeron con el aumento de la temperatura. Los tres intervalos de temperatura (temperaturas de 25 °C, 40 °C y 50 °C) para cada intervalo de tiempo observado se muestra como un grupo de tres barras de izquierda a derecha como 2010 y 2110, en las FIGS. 20 y 21. Las inoculaciones mostradas se realizaron en buffer de arginina con concentraciones proteicas de 30 g/L.

Ejemplo 9

Efecto de la temperatura elevada en el flujo del proceso

Se evaluaron muestras de E25 a 10 g/L en 0,2M de arginina, 25 mM de histidina, buffer de pH de 6,0 en cuanto a su influencia en el flujo a comparación de la presión transmembrana (PTM). La FIG. 22 muestra que elevar la temperatura del sistema también incrementó el flujo del proceso durante las operaciones de UF/DF. Se realizaron picos de flujo a varias concentraciones en volumen y tres temperaturas diferentes de 23 °C (2210), 40 °C (2220) y 46 °C (2230). El coeficiente de transferencia de masa y el flujo de filtrado se incrementaron de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 veces, originando tiempos de proceso considerablemente reducidos.

Ejemplo 10

Formulación de alta concentración de rhuMAB anti-CD20 ("2H7")

Un sistema de UF en escala piloto se usó para concentrar y formular rhuMAb anti-CD20 (2H7; un anticuerpo monoclonal humano recombinante). Se repitió el Ejemplo 1 con las siguientes excepciones. Los sistemas de Ultrafiltración / Diafiltración de Millipore Pelicon se ensamblaron con una membrana compuesta de celulosa regenerada de 1,6 m² (17,5 sqft), con un tamaño de poro de 30.000 Dalton. El sistema consistió de un soporte de membrana, una bomba de alimentación de lóbulo rotatorio Viking S1 L, una tubería de recirculación de acero inoxidable 316L de 1,27 cm (½"), y un recipiente de recirculación de 40 L. las válvulas de regulación de retención fueron de H.D. Baumann, Inc. La temperatura del glicol alimentado en la camisa de aislamiento del tanque fue regulada en forma ascendente o descendente según fue necesario usando un intercambiador de calor eléctrico, un suministro de glicol frío, o ambos.

Durante esta etapa, la tasa de flujo de alimentación se fijó a una tasa constante de 0,14 L/s (8,5 L/min) (aproximadamente 0,09 L/s/m² (0,5 L/min/ft²)). La FIG. 23 ilustra que las tendencias de valores en el tiempo en cuanto a la tasa de flujo de alimentación (210) escalaron de 0 a 20, el pH (212) escaló de 2 a 12, la tasa de flujo del filtrado (250) escaló de 0 a 5, el nivel del tanque de reciclado (2320) escaló de 0 a 45, y el dP del retentado (2350) escaló de 0 a 100 durante las varias fases o modalidades del proceso incluyendo UF1 (10), DF1 (20) y UF2 (30).

Durante las operaciones de ultrafiltración y diafiltración el sistema usó presión constante del retentado seguido de un esquema de control de presión delta constante de alimentación / retentado para controlar el flujo a través de la membrana. El buffer de diafiltración (30 mM de acetato sódico / pH 4,9) se preparó en un tanque separado. La temperatura de este buffer se fijó en 45 °C previo al proceso para un control de temperatura certero en todo el proceso. Previo al procesamiento, la solución de almacenamiento del sistema (0,1 N de NaOH) se lavó en un solo paso a modo de desagüe, en primer lugar con 10,8 L/m² (1 L/ft²) de agua para inyección (API) y luego con 10,8 L/m² (1 L/ft²) de buffer de diafiltración. Después de los lavados, el sistema se equilibró para recircular 5,4 L/m² (0,5 L/ft²) de buffer de diafiltración durante 10 minutos. El pH de la solución recirculada se chequeó para confirmar la equilibración.

Se midió el combinado proteico resultante de un paso de cromatografía Q-Sefarosa precedente hasta alcanzar 2,31 g de 2H7/L y tuvo un volumen de 356 L. La proteína se presentó en una solución de 6 mM de ácido libre HEPES / 19 mM

de sal sódica de HEPES y 25 mM de acetato sódico en donde el pH se había ajustado a 5,3 con 0,5 M de ácido acético. Justo antes de la etapa, el punto fijo de la temperatura se fijó a 45 °C. Para comenzar la etapa, el combinado proteico se transfirió al recipiente de recirculación a través de un filtro de grado esterilizante de 0,22 micrones a un nivel de aproximadamente 40 L en el tanque. En el recipiente, el combinado se agitó mediante el impulsor de montaje superior y la temperatura se mantuvo a 40-50 °C.

Como el combinado entrante era mayor que el recipiente de recirculación, el proceso de UF1 comenzó en modo de alimentación por tandas (véase FIG. 23). En este modo, el Combinado-Q se agregó al recipiente de recirculación a aproximadamente la misma tasa a la cual el filtrado atraviesa la membrana FFT al desagüe. Después de que el Combinado-Q restante se transfirió al recipiente de recirculación, el proceso de UF1 continuó en modo por tandas. Durante la UF1 el combinado se concentró a aproximadamente 50 g de 2H7/L (aproximadamente 16 L). El combinado se diafiltró luego con 10 diavolúmenes de buffer de diafiltración. Durante la diafiltración la temperatura se mantuvo entre 40 y 50 °C. La diafiltración se efectuó a un volumen constante, lo que se logró al combinar la tasa de flujo del buffer transferido al tanque de recirculación con el filtrado extraído del sistema. Al término de la diafiltración, el combinado se concentró adicionalmente en modo de UF2 a un punto fijo buscado de la concentración final de 190 g de 2H7/L (4,3 L). Véase en la FIG. 23 la incorporación del control de dP constante a 344,7 kPa (50 psig) al final de esta fase. Esta fase se efectuó luego a un punto fijo de temperatura elevada de 45 °C +/- 5 °C. Posteriormente, se efectuó una mezcla con caída a baja presión en donde la bomba de alimentación se controló para mantener una caída de presión de 137,9 kPa (20 psig) a través del canal de alimentación. Se tomó una muestra y se efectuaron mediciones de densidad para confirmar la concentración previa a la recuperación. La concentración de esta muestra fue de 189 g de 2H7/L. La Tabla 18 resume los resultados del rendimiento y flujo.

Tabla 18.

Fase de proceso	Rendimiento Normalizado g/m²/s (g/ft²/hr)	Flujo normalizado LMH/kPa (LMH/psig)
UF1	0,10 (32)	0,70 (4,8)
DF	0,17 (56)	0,35 (2,4)
UF2	0,80 (267)	0,23 (1,6)

El combinado proteico se recuperó mediante una serie de pasos. En primer lugar, el producto se desplazó de una membrana en un modo de paso simple usando 0, 2 L de buffer de DF agregado a la línea del retentado. El producto se filtró en el tanque de recuperación a través de un filtro final de grado esterilizante de 0,22 micrones. El combinado en el tanque de recirculación se bombeó luego desde el tanque usando la bomba de alimentación de lóbulo rotatorio. A continuación, la solución proteica residual se desplazó desde el tanque y la línea de alimentación con una purga de gas nitrógeno a 34,5 kPa (5 psig). La fase final comprendió una purga en la unidad de membrana que contenía buffer de DF del desplazamiento inicial del producto. Esta fase también usó 34,5 kPa (5 psig) de gas nitrógeno aplicado al punto máximo de la línea del retentado.

De ser necesario, el combinado recuperado se diluyó primero a aproximadamente 175 g de 2H7/L usando buffer de dilución (30 mM de acetato de sodio, pH 5,3). Finalmente, el combinado se diluyó a una concentración buscada de 150 g de 2H7/L y se acondicionó en la formulación final de 30 mM de acetato sódico, 7 % de trealosa, 0,03 % de polisorbato 20, pH 5, mediante un buffer de acondicionamiento 7 X (30 mM de acetato sódico, 49 % de trealosa, 0,21 % de polisorbato 20, pH 5,3).

Los volúmenes del combinado recuperado, combinado diluido, y combinado acondicionado se analizaron con respecto a la concentración proteica. La Tabla 19 presenta los resultados.

Tabla 19.

	Volumen (L)	Concentración (g/L)	Masa (g)	Rendimiento o {Pérdida} (%)
Combinado-Q	355,81	2,31	821,92	100,0
Combinado recuperado	4,64	180,02	835,3	101,6
Combinado final	4,871	149,40	727,7	88,5

Nota: Los rendimientos incluyen pérdida debido a la toma de muestras. El volumen y concentración del combinado recuperado incluye adición del desplazamiento de buffer.

Después del proceso, la membrana se regeneró usando un paso único de lavado de 0,1 N de NaOH, 10,8 L/m² (1L/ft²) seguido por 5,4 L/m² (0,5 L/ft²) de recirculación total durante 30 minutos. Esto fue seguido por 10,8 L/m² (1L/ft²) de lavado de agua purificada. Esto fue seguido por una recirculación total de 5,4 L/m² (0,5 L/ft²) de 14 % de solución de Minncare durante 30 minutos. El sistema se lavó nuevamente con 10,8 L/m² (1L/ft²) de agua purificada y finalmente recirculado durante 15 minutos con 0,1 N de NaOH y se almacenó.

Ejemplo 11

Formulación de alta concentración de rhuMAb anti-CD20

Se usó un sistema piloto de UF en escala para concentrar y formular rhuMAb anti-CD20 (2H7) para uso en un estudio clínico de fase I de un ser humano en una instalación de fabricación de GMP. Se repitió el Ejemplo 10 con las siguientes excepciones.

El combinado proteico resultante de un paso de cromatografía Q-Sefarosa precedente se midió para ser de 3,729 g de 2H7/L y tuvo un volumen de 262 L. La proteína estuvo comprendida en una solución de 6 mM de ácido libre de HEPES / 19 mM de sal sódica de HEPES y 25 mM de acetato sódico cuyo pH se ajustó a pH 5,3 con 0,5 M de ácido acético. Justo antes de la etapa, el punto fijo de temperatura de este combinado fue fijado a 45 °C. Para comenzar la etapa, el combinado proteico se transfirió al recipiente de recirculación a través de un filtro

de grado esterilizante de 0,22 micrones a un nivel de aproximadamente 40 L en el tanque. En el recipiente, el combinado se agitó mediante el impulsor de montaje superior y la temperatura se mantuvo a 40-50 °C.

Durante la UF1 el combinado se concentró a aproximadamente 50 g de 2H7/L (aproximadamente 20 L). La FIG. 24 muestra las tendencias de valores en el tiempo: el nivel del tanque de reciclado (210) escaló de -0,713963 a 295.989, el dP del retentado (2420) escaló de -0,237899 a 98,6629, la tasa de flujo de alimentación (250) escaló de -0,356981 a 147,994, y la tasa de flujo del filtrado (2450) escaló de -0,118994 a 49.3315, durante el proceso. Luego se diafiltró el combinado con 10 diavolúmenes de buffer de diafiltración. Durante la diafiltración, la temperatura se mantuvo entre 40 y 50 °C. La diafiltración se realizó a un volumen constante, lo que se logró al combinar la tasa de flujo del buffer transferido en el tanque de recirculación con la tasa de flujo del filtrado extraído del sistema. Al término de la diafiltración, el combinado se concentró adicionalmente en modo de UF2 a un punto fijo buscado de concentración final de 190 g de 2H7/L (5,25 L). Nótese en la FIG. 24 la incorporación de la constante dP al control de 275,8 kPa (40 psig) al final de esta fase. Esta fase también se efectuó a un punto fijo de temperatura elevada de 45 °C +/-5 °C. A continuación, se efectuó una mezcla con caída a baja presión en donde la bomba de alimentación se controló para mantener una caída de presión de 137,9 kPa (20 psig) a través del canal de alimentación. Se tomó una muestra y se realizaron mediciones de densidad para confirmar la concentración previamente a la recuperación. La concentración de esta muestra fue de 194 g de 2H7/L. La Tabla 20 resume los resultados de rendimiento y flujo.

Tabla 20.

Fase de proceso	Rendimiento Normalizado g/m ² /s (g/ft ² /hr)	Flujo normalizado LMH/kPa (LMH/psig)
UF1	0,15 (51)	0,55 (3,8)
DF	0,14 (46)	0,32 (2,2)
UF2	0,86 (286)	0,23 (1,6)

Justo antes de la recuperación del producto, se tomó una muestra de 30 mL y se entregó para detección y tipificación de biocarga. Los resultados fueron negativos (es decir, <0,13 de UFC/mL).

El combinado proteico se recuperó mediante una serie de pasos del Ejemplo 10. Los volúmenes del combinado recuperado, combinado diluido, y combinado acondicionado se analizaron luego en cuanto a la concentración proteica. La Tabla 21 presenta los resultados. La membrana se regeneró como en el Ejemplo 10.

Tabla 21.

	Volumen (L)	Concentración (g/L)	Masa (g)	Rendimiento o {Pérdida} (%)
Combinado-Q	262	3,72	977	100
Combinado recuperado	5,0	174,0	863,0	88,3
Combinado diluido	5,421	149,6	811,0	83,0

Ejemplo 12

Formulación de alta concentración de rhuMAb anti-CD20 GMP

Se repitió el Ejemplo 11 con las siguientes excepciones. Se midió al combinado proteico resultante de un paso de cromatografía Q-Sefarosa precedente hasta alcanzar 5,106 g de 2H7/L y tuvo un volumen de 196 L. La proteína estuvo comprendida en una solución de 6 mM de ácido libre de HEPES / 19 mM de sal sódica de HEPES y 25 mM de acetato sódico cuyo pH se había ajustado a 5,3 con 0,5 M de ácido acético. Justo antes de la etapa, el punto fijo de la temperatura de este combinado se reguló a 45 °C. Para comenzar la etapa, el combinado proteico se transfirió al recipiente de recirculación a través de un filtro de grado esterilizante de 0,22 micrones a un nivel de aproximadamente 40 L en el tanque. En el recipiente, el combinado se agitó mediante el impulsor de montaje superior y la temperatura se mantuvo a 40-50 °C.

Durante la UF1 el combinado se concentró a aproximadamente 50 g de 2H7/L (aproximadamente 20 L). La FIG. 25 muestra las tendencias de valores en

40
67

el tiempo: el nivel del tanque de reciclado (210) escaló de 0 a 300, el dP del retentado (2520) escaló de 0 a 100, la tasa de flujo de alimentación (250) escaló de 0 a 150, y la tasa de flujo del filtrado (2550) escaló de 0 - 50 durante el proceso. El combinado se diafiltró con 10 diavolúmenes (10 X) de buffer de diafiltración. Durante la diafiltración, la temperatura se mantuvo entre 40 y 50 °C. La diafiltración se efectuó a un volumen constante que se alcanzó al combinar la tasa de flujo de buffer transferido al tanque de recirculación con la tasa de flujo de filtrado extraído del sistema. Al término de la diafiltración, el combinado se concentró adicionalmente en el modo de la UF2 a un punto fijo buscado de la concentración final de 190 g de 2H7/L (5,26 L) utilizando nuevamente un control de dP constante justo al término de esta fase (véase la FIG. 25). Esta fase se efectuó a un punto fijo de temperatura elevada de 45 °C +/- 5 °C. A continuación, se efectuó una mezcla con caída a baja presión en donde la bomba de alimentación se controló para mantener una caída de presión de 137,9 kPa (20 psig) a través del canal de alimentación. Se tomó una muestra y se realizaron mediciones de densidad para confirmar la concentración previamente a la recuperación. La concentración de esta muestra fue de 191 g de 2H7/L. La Tabla 22 resume los resultados de rendimiento y flujo.

Tabla 22.

Fase de proceso	Rendimiento Normalizado g/m ² /s (g/ft ² /hr)	Flujo normalizado LMH/kPa (LMH/psig)
UF1	0,20 (67)	0,52 (3,6)
DF	0,14 (47)	0,39 (2,1)
UF2	0,87 (292)	0,26 (1,8)

Justo antes de la recuperación del producto, se tomó una muestra de 30 mL y se entregó para detección y tipificación de biocarga. Los resultados fueron negativos (es decir, <0,13 de UFC/mL). El combinado proteico se recuperó mediante una serie de pasos como en el Ejemplo 11. Los volúmenes del combinado recuperado, combinado diluido y combinado acondicionado, fueron

5/68

analizados luego en cuanto a la concentración proteica. La Tabla 23 presenta los resultados. La membrana se regeneró como en el Ejemplo 11.

Tabla 23.

	Volumen (L)	Concentración (g/L)	Masa (g)	Rendimiento o {Pérdida} (%)
Combinado-Q	196	5,106	1000	100
Combinado recuperado	4,9	187,1	918,0	91,8
Combinado diluido	6,075	150,9	916,9	91,7

Todas las publicaciones, patentes y documentos de patentes se incorporan a la presente enteramente e individualmente a modo de referencia. La invención ha sido descrita con referencia a varias técnicas y realizaciones específicas y preferidas. No obstante, debe entenderse que muchas variaciones y modificaciones pueden ser efectuadas al tiempo que mantienen el espíritu y alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar composiciones de proteína altamente concentradas que comprende:
 - a) una primera ultrafiltración de una primera preparación de proteína para obtener una segunda preparación de proteína;
 - b) una diafiltración de la segunda preparación de proteína para obtener una preparación de proteína intermediaria diafiltrada; y
 - c) una segunda ultrafiltración de la preparación de proteína intermediaria diafiltrada para obtener una tercera preparación de proteína;CARACTERIZADO porque, una o más de las etapas a), b) y c) son llevadas a cabo a una temperatura de 30 °C a 70 °C.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque una o más de las etapas a), b) y c) son llevadas a cabo a una temperatura de 30 °C a 50 °C.
3. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, CARACTERIZADO porque una o más de las etapas a), b) y c) son llevadas a cabo a una temperatura de 35 °C a 50°C.
4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, CARACTERIZADO porque una o más de las etapas a), b) y c) son llevadas a cabo a una temperatura de 45°C.
5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, CARACTERIZADO porque una o más de las etapas a), b) y c) son llevadas a cabo a una temperatura de 40°C a 50°C.
6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque las etapas b) y c) son llevadas a cabo a una temperatura de 40°C a 50°C.
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, CARACTERIZADO porque las etapas a), b) y c) son llevadas a cabo a una temperatura de 40°C a 50°C.

8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, CARACTERIZADO porque la velocidad de filtración es suficiente para permitir la terminación de las etapas combinadas a), b) y c) en un tiempo de 1 a 10 horas.
9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, CARACTERIZADO porque la velocidad de filtración es suficiente para permitir la terminación de las etapas combinadas a), b) y c) en un tiempo de 2 a 5 horas.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque la velocidad de filtración es suficiente para permitir la terminación de las etapas combinadas a), b) y c) en 3 horas.
11. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, CARACTERIZADO porque la primera preparación de proteína tiene una concentración de proteína de 0.1 a 10 gramos por litro.
12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque la primera preparación de proteína tiene una concentración de proteína de 1 a 5 gramos por litro.
13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de proteína tiene una concentración de proteína de 50 a 250 gramos por litro.
14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de proteína tiene una concentración de proteína de 100 a 230 gramos por litro.
15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 14, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de proteína tiene una concentración de proteína de 170 a 200 gramos por litro.
16. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, CARACTERIZADO porque el rendimiento total para la etapa c) es de 0.24 gr/m²/s, 0.36 gr/m²/s, 0.40 gr/m²/s, 0.45 gr/m²/s, 0.52 gr/m²/s, 0.54 gr/m²/s, 0.79 gr/m²/s, 0.85 gr/m²/s o 0.87 gr/m²/s.

17. El proceso cualquiera de las reivindicaciones 1-16, CARACTERIZADO porque el rendimiento de la tercera preparación de proteína desde las etapas combinadas a), b) y c) es superior a 70% en peso.
18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO porque el rendimiento de la tercera preparación de proteína desde las etapas combinadas a), b) y c) es de 80% en peso a 100% en peso.
19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADO porque el rendimiento de la tercera preparación de proteína desde las etapas combinadas a), b), y c) es superior a 98% en peso.
20. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, CARACTERIZADO porque los niveles de contaminantes agregados son inferiores al 2% en peso.
21. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, CARACTERIZADO porque las etapas de filtración a), b) y c), utilizan una membrana de ultrafiltración.
22. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, CARACTERIZADO porque las etapas de filtración a), b), y c) se logran por medio de un flujo tangencial a través una membrana de ultrafiltración.
23. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, CARACTERIZADO porque una membrana de ultrafiltración utilizada en las etapa de filtración a) es usada en la etapa b) y en la etapa c).
24. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-23, CARACTERIZADO porque la membrana de ultrafiltración comprende una membrana de ultrafiltración con componente de celulosa regenerada.
25. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-24, CARACTERIZADO porque la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro nominal de 5 a 50 kilo Daltons.

26. El proceso de acuerdo con la reivindicación 25, CARACTERIZADO porque la membrana de ultrafiltración tiene un tamaño de poro nominal de 10 a 30 kilo Daltons.
27. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-26, CARACTERIZADO porque la primera preparación de proteína comprende una proteína que tiene un peso molecular aparente de 100 a 200 kilo Daltons.
28. El proceso de acuerdo con la reivindicación 27, CARACTERIZADO porque la primera preparación de proteína comprende una proteína que tiene un peso molecular aparente de 150 kilo Daltons.
29. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-28, CARACTERIZADO porque la diafiltración intercambia un búfer que tiene una composición que difiere de aquella de la etapa a).
30. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-29, CARACTERIZADO porque la etapa de diafiltración intercambia fluido a un volumen sustancialmente constante, una concentración de proteína sustancialmente constante, o ambas.
31. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-30, CARACTERIZADO porque las etapas combinadas a), b), y c) se logran a una presión transmembrana de 10 a 50 p.s.i.
32. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-31, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de proteína tiene una biocarga detectable inferior a 100 CFU/ml.
33. El proceso de acuerdo con la reivindicación 32, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de proteína tiene una biocarga detectable de 1.8 CFU/ml.
34. El proceso de acuerdo con la reivindicación 32, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de proteína tiene una biocarga detectable inferior a 0.13 CFU/ml.

35. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-34, CARACTERIZADO porque la segunda preparación de proteína tiene una concentración de proteína de 20 a 50 gramos por litro.
36. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y 16-35, CARACTERIZADO porque la preparación de proteína intermediaria diafiltrada tiene una concentración de proteína de 25 a 35 gramos por litro y la tercera preparación de proteína tiene una concentración de proteína de 170 a 200 gramos por litro.
37. Un proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y 16-35, CARACTERIZADO porque la primera ultrafiltración concentra la primera preparación de proteína para obtener la segunda preparación de proteína que tiene una concentración de proteína de 30 gramos por litro y la segunda ultrafiltración concentra la preparación de proteína intermediara diafiltrada para obtener la tercera preparación de proteína que tiene una concentración de proteína de 170 a 200 gramos por litro.
38. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-22 y 24-37, CARACTERIZADO porque la primera y segunda ultrafiltración se logran a través de la misma membrana ultra-filtro.
39. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-38, CARACTERIZADO porque la diafiltración logra un intercambio de búfer en un volumen de 5 a 15 veces mayor.
40. El proceso de acuerdo con la reivindicación 39, CARACTERIZADO porque la diafiltración logra un intercambio de búfer en un volumen de 8 veces mayor.
41. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-40, CARACTERIZADO porque la diafiltración intercambia un primer búfer por un segundo búfer.
42. El proceso de acuerdo con la reivindicación 41, CARACTERIZADO porque el primer buffer comprende una mezcla de cloruro de sodio acuoso y un búfer

TRIS, y el segundo búfer comprende una mezcla de cloruro de histidina y cloruro de arginina acuosos.

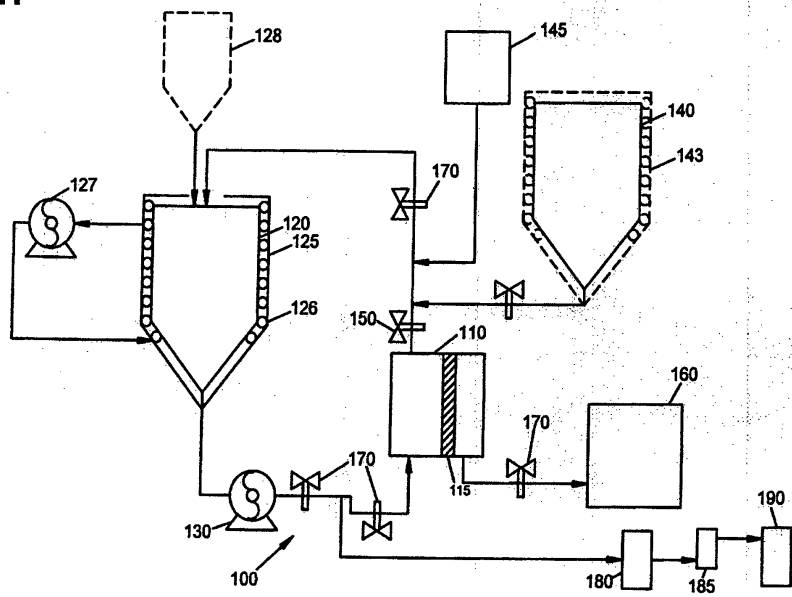
43. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-42, CARACTERIZADO porque la proteína es un anticuerpo.
44. El proceso de acuerdo con la reivindicación 43, CARACTERIZADO porque el anticuerpo comprende un anticuerpo anti-IgE.

58
75

Resumen

La presente invención se relaciona con un proceso para concentrar proteínas que incluye una ultrafiltración, una diafiltración, y una segunda secuencia de ultrafiltración, a temperaturas elevadas, tales como las superiores a aproximadamente 30 °C. La invención también incluye un proceso para preparar composiciones de anticuerpos altamente concentradas, y productos de anticuerpos altamente concentrados.

FIG.1



9/2/21

60
77

FIG.2

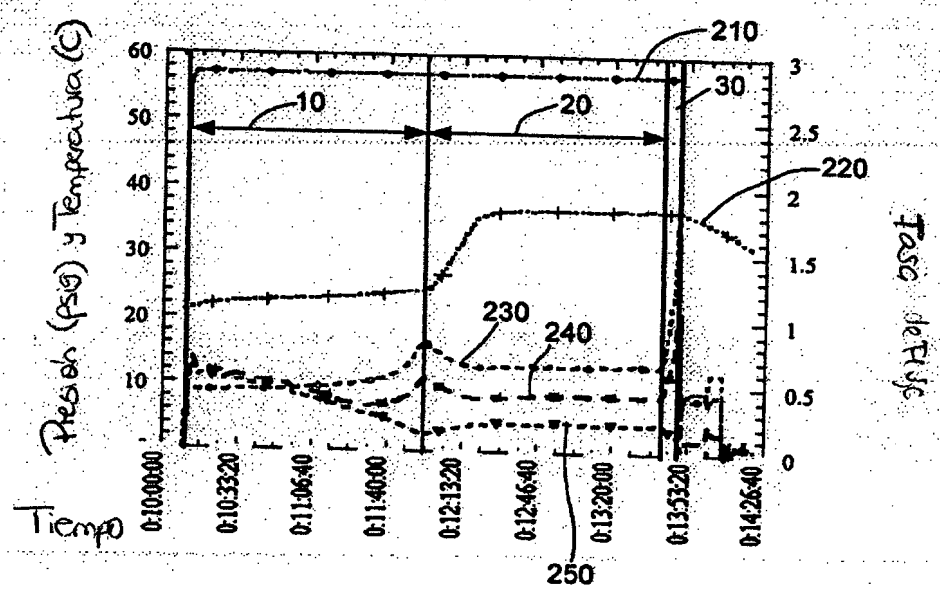
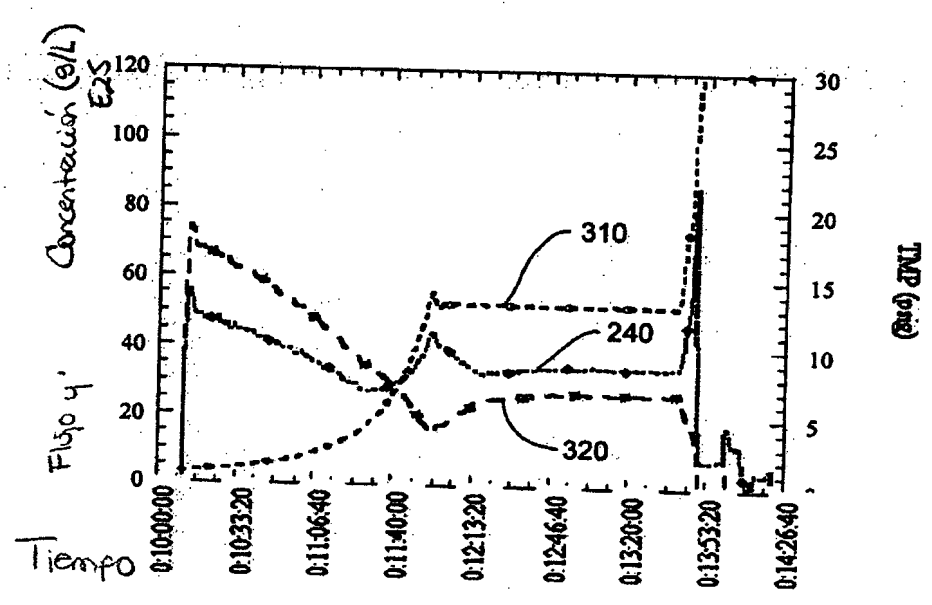
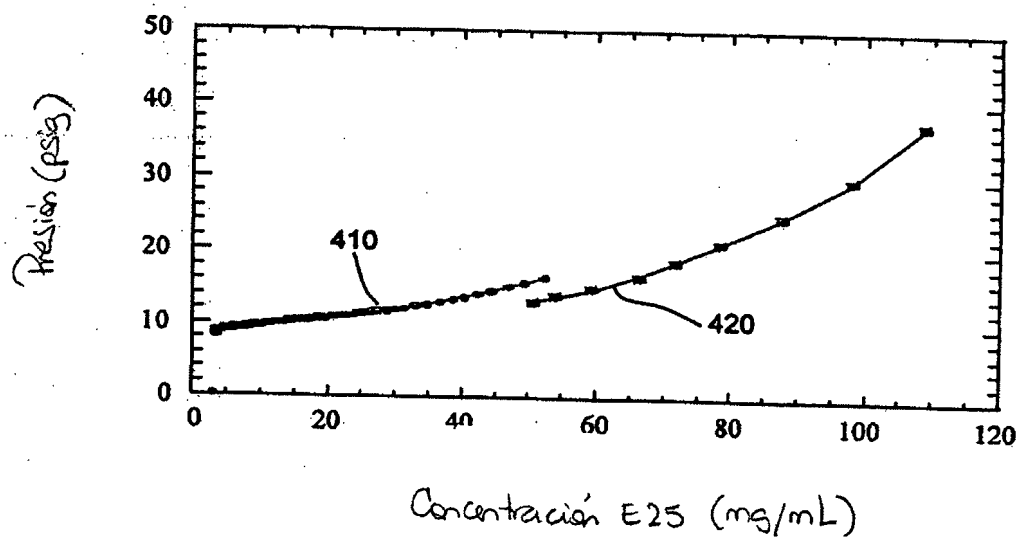


FIG.3



65
70

FIG.4



62
79

FIG.5

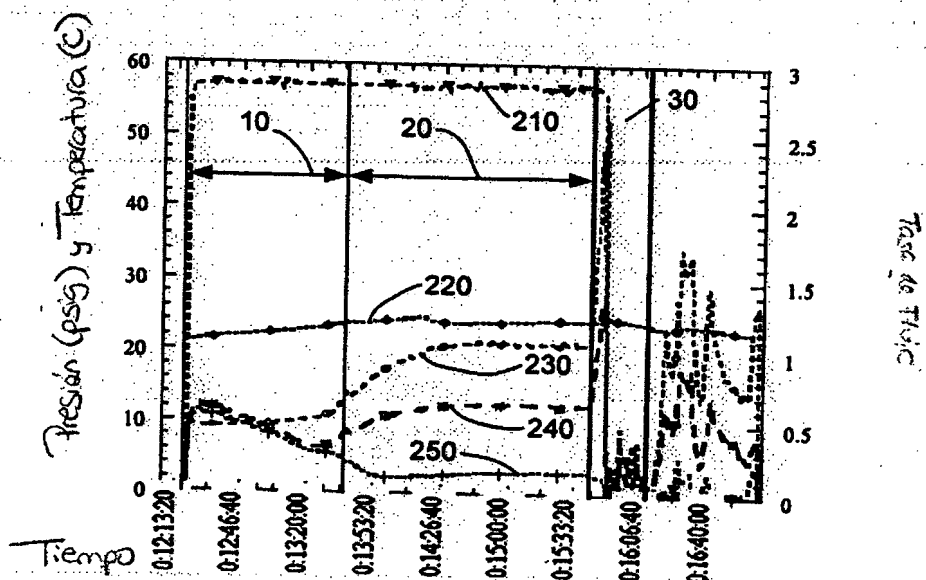
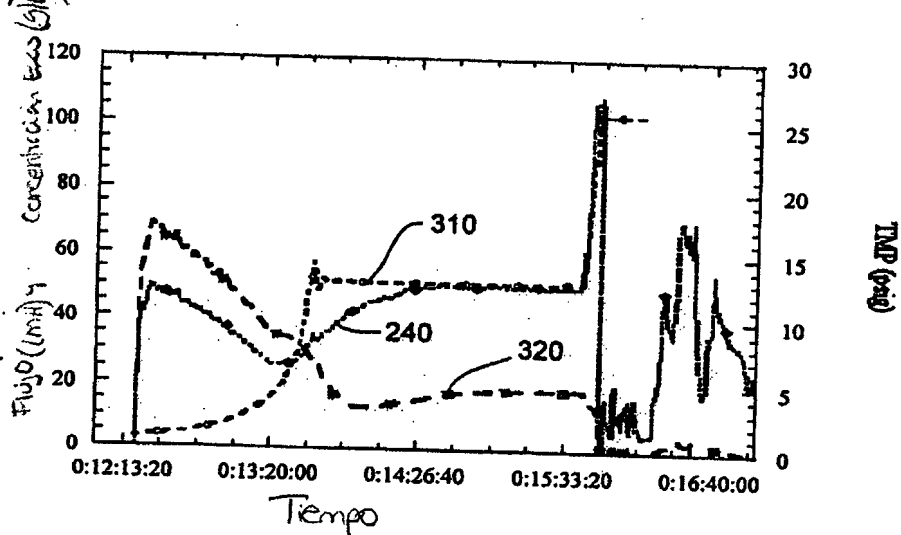
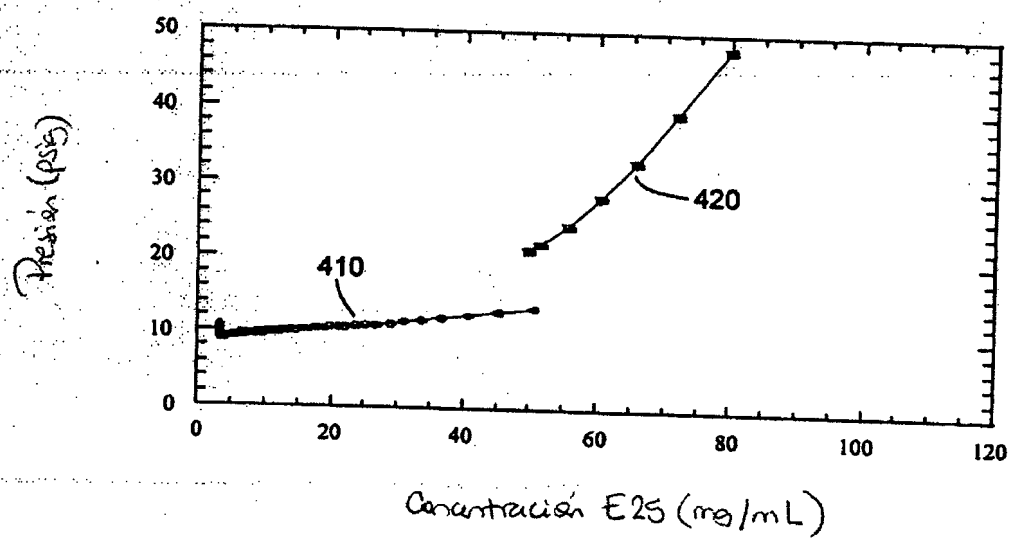


FIG.6



63
80

FIG.7

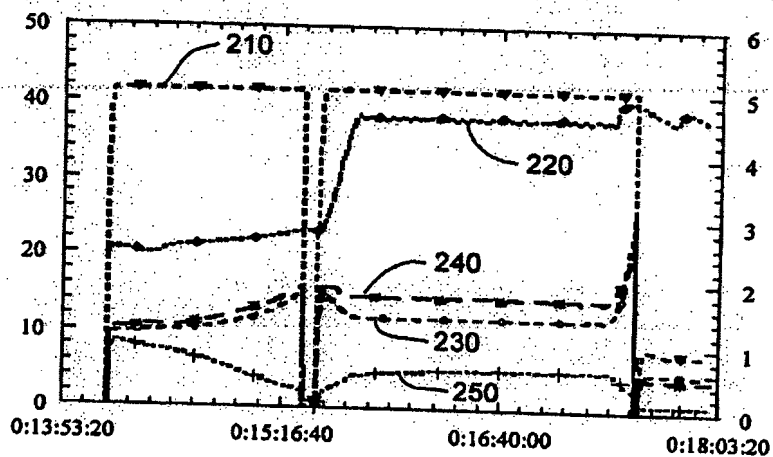


64
81

FIG.8

Presión (psig) y Temperatura (°C)

Tiempo



Tasa de flujo

FIG.9

Flujo (LmH) y Concentración E26 (g/L)

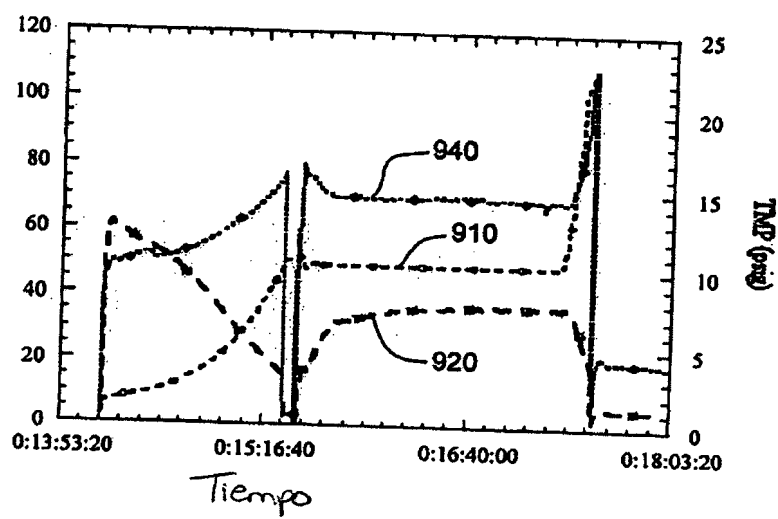


FIG.10

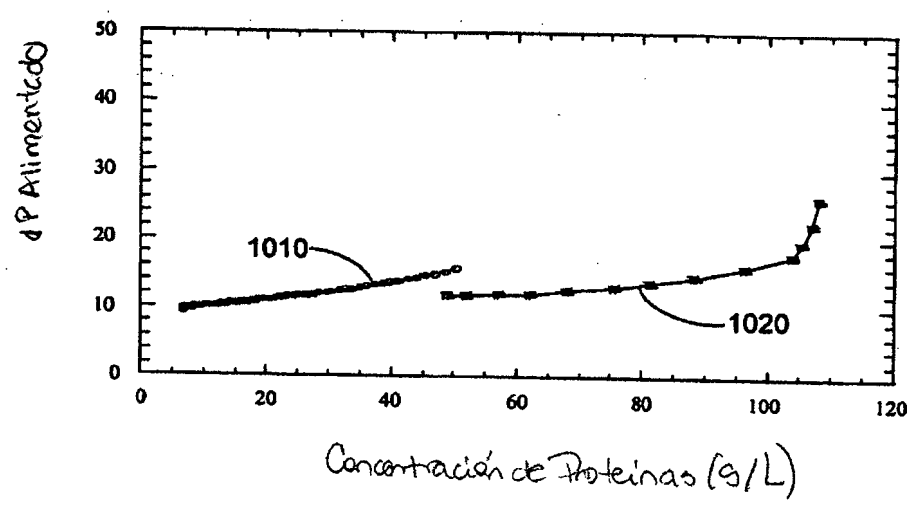
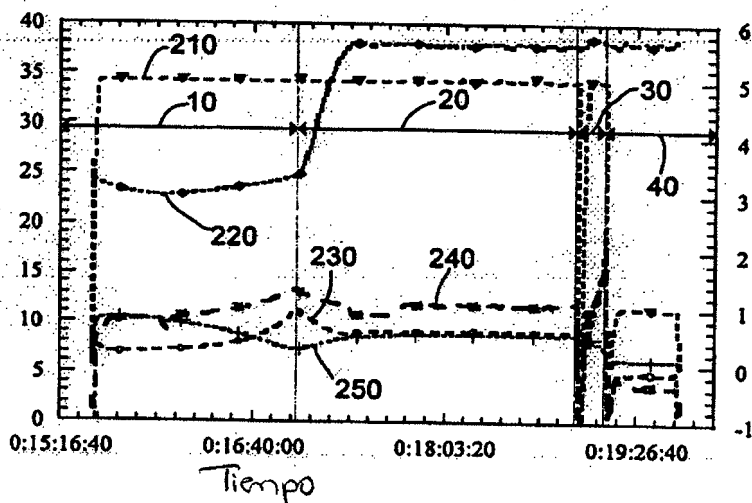


FIG.11

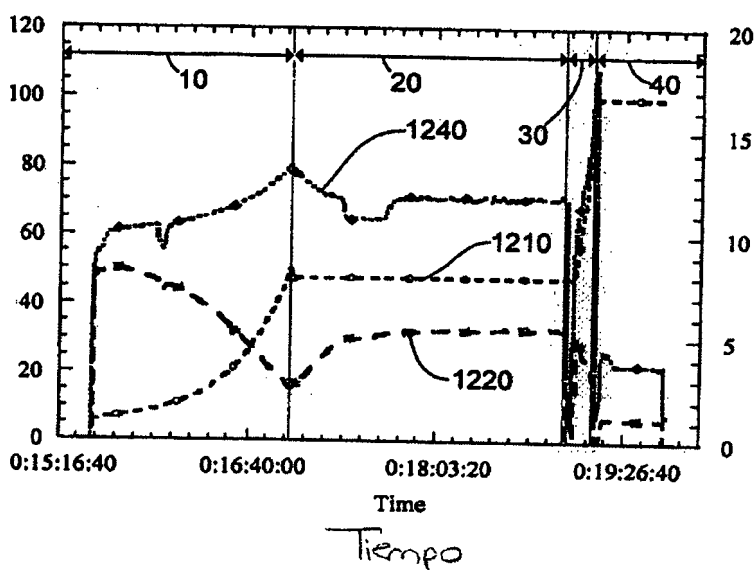
Presión (psig) y Temperatura (°C)



Tasa de flujo (L/min)

FIG.12

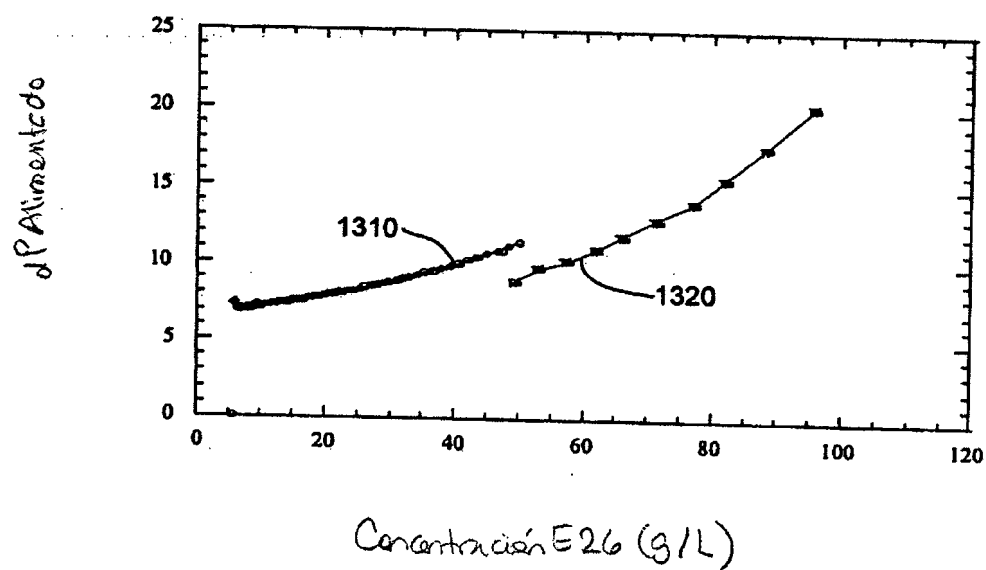
E26 Concentration (g/L)
Concentración E26 (g/L)



TMP (psig)

67
84

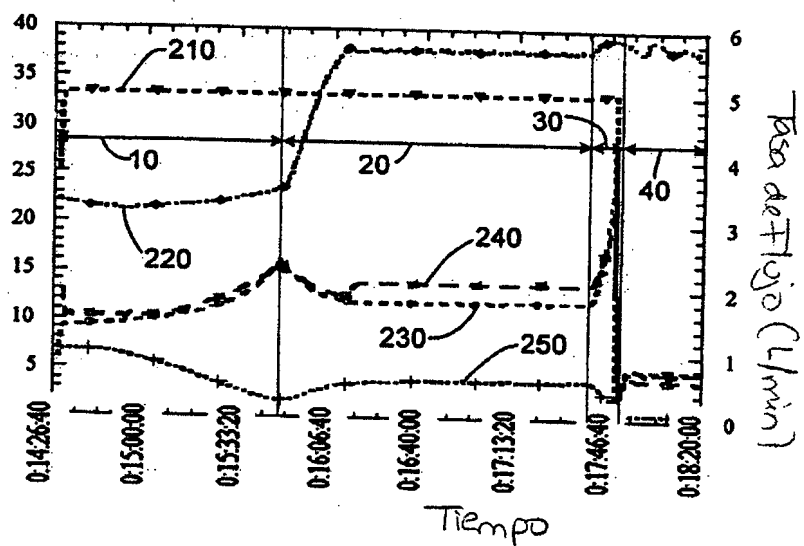
FIG.13



68
85

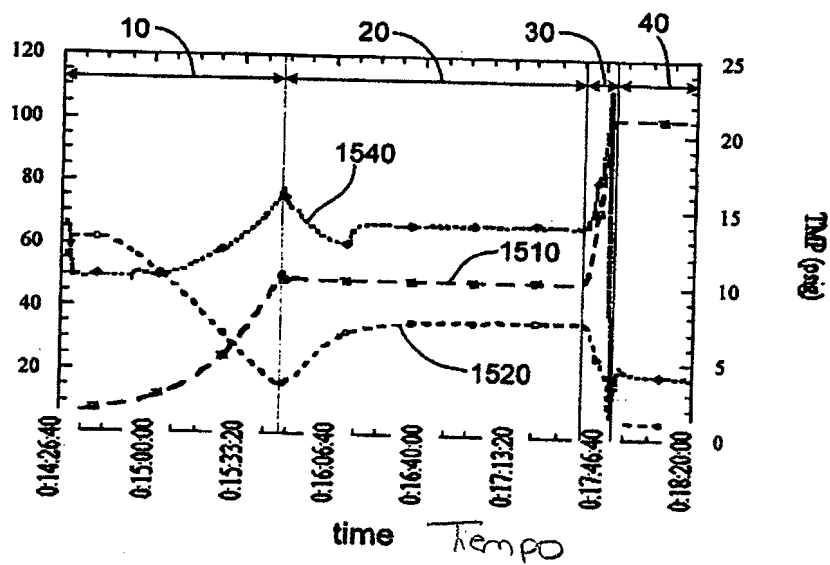
FIG.14

Presión (psig) y Temperatura (°C)



Flujo (L/H) y Concentración E 26 (g/L)

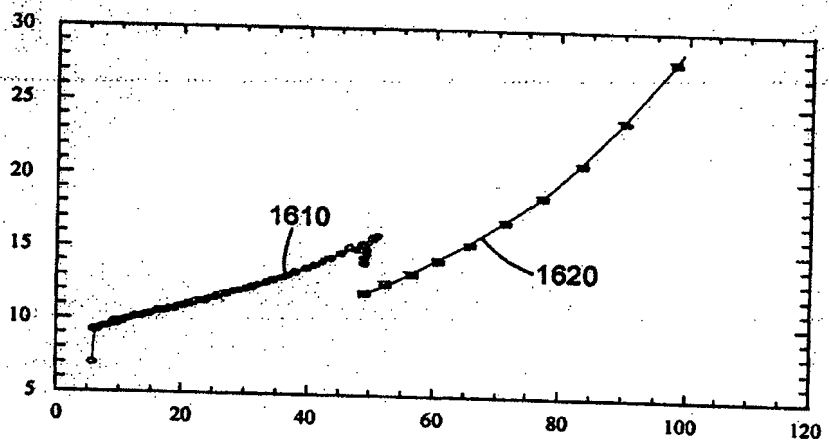
FIG.15



69
36

FIG.16

Caida de presión (psig)



Concentración E26 (g/L)

70
87

FIG.17

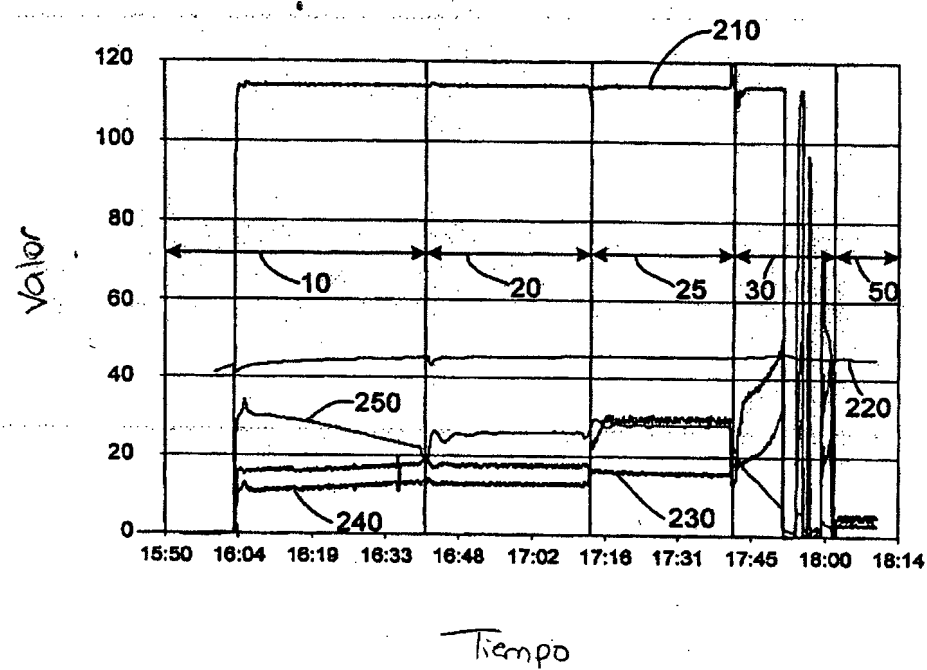


FIG.18

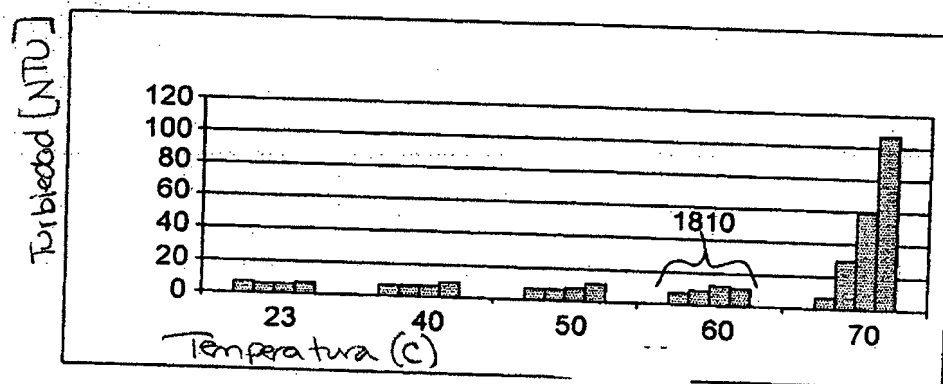


FIG.19

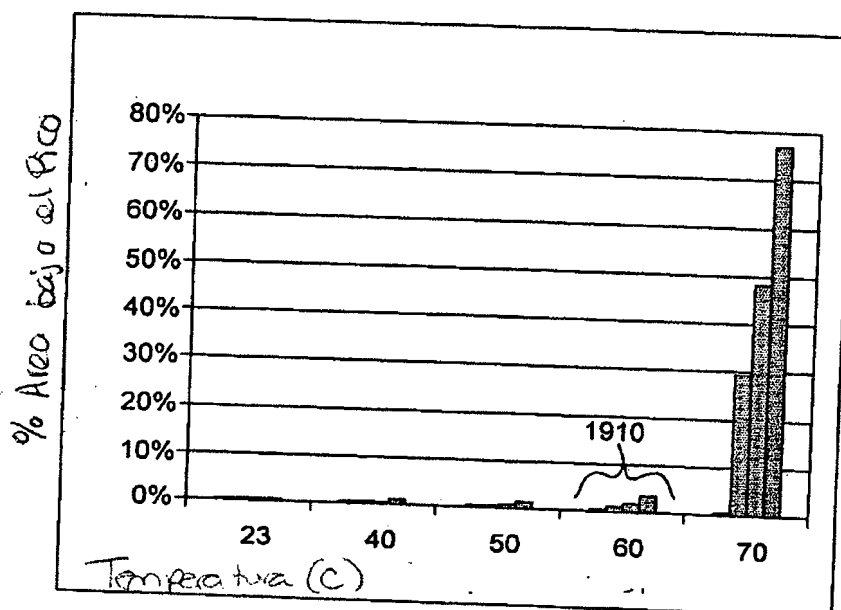


FIG.20

Reducción de Log

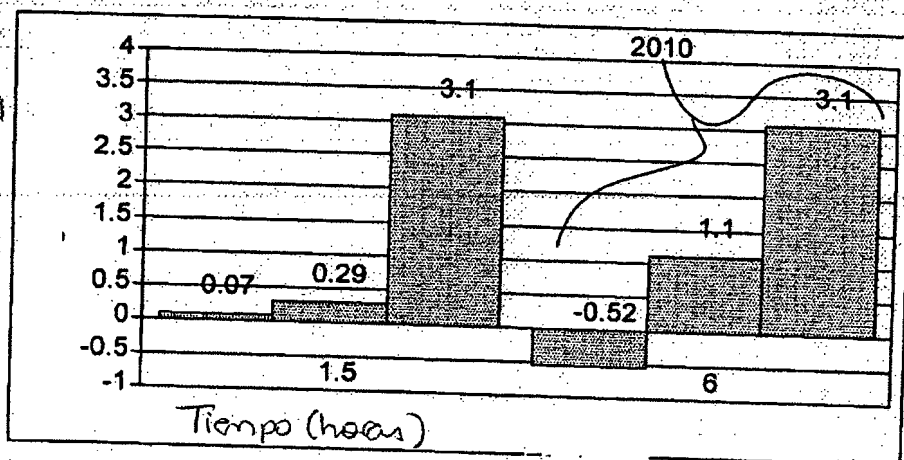


FIG.21

Reducción de Log

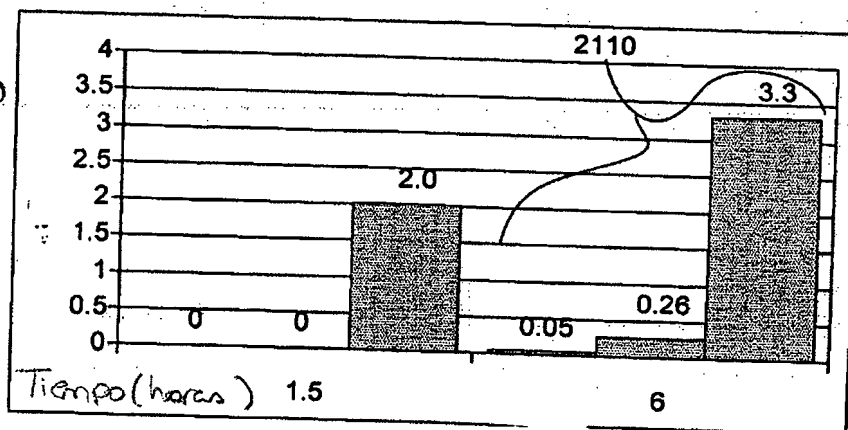


FIG.22

Flujo [LmH]

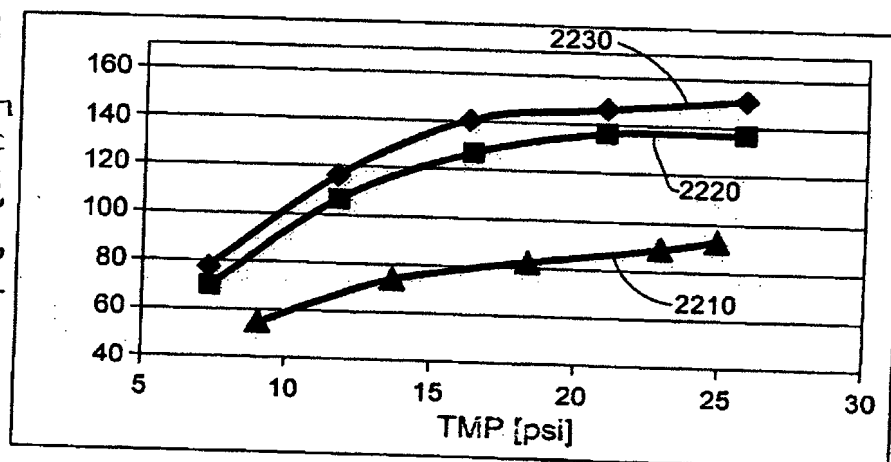


FIG.23

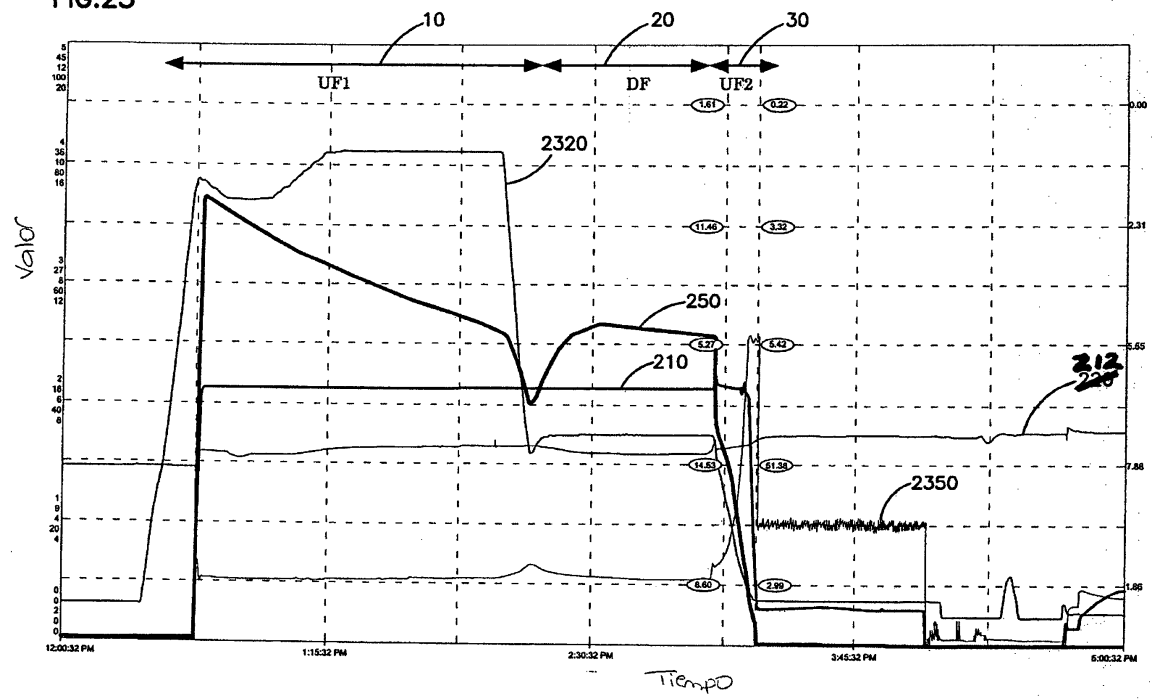
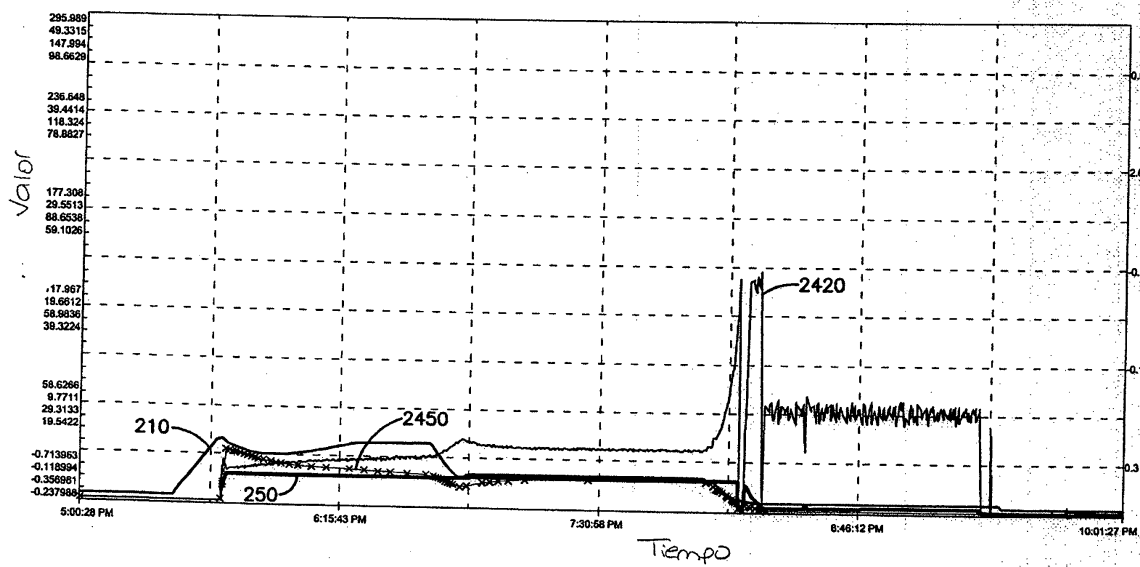
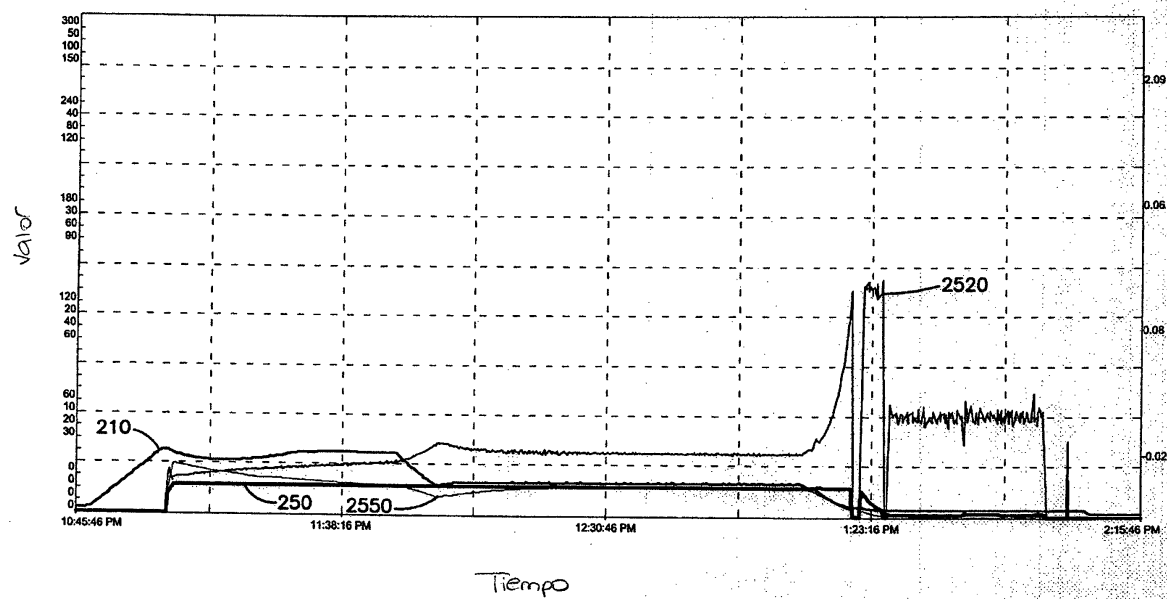


FIG.24



4b

FIG.25

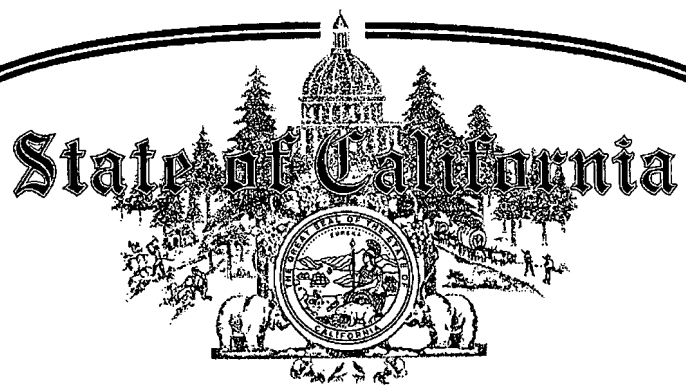


Tiempo

25

76
93

AS: 103276



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 Christine Marie Ricks*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Christine Marie Ricks, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 19th day of June 2007*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 404592*
9. *Seal/Stamp:*

10. Signature



Jana Bowen
Secretary of State

BY *[Signature]*

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo

On June 11, 2007 before me, Christine Ricks, Notary Public

personally appeared Charles M. Winter

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.



Place Notary Seal Above

Signature [Signature] 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: Deed of Assignment

Document Date: June 11, 2007 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: Charles M. Winter

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

Signer Is Representing:

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER Top of thumb here

Signer's Name:

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

Signer Is Representing:

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER Top of thumb here

77
94

DEED OF ASSIGNMENT

Be it known that the undersigned

Charles Matthew Winter, of 2433 Coronet Blvd, Belmont, California 94002 USA

states under oath to be the sole and true assignor of

Process For Concentration Of Antibodies And Therapeutic Products Thereof

based on priority applications:

U.S. Serial No. 60/609092

Filed on 09 September 2004

U.S. Serial No. 11/220,362

Filed on 06 September 2005

and that he assigns without reservations limitations in favor of

GENENTECH, INC.

1 DNA Way

South San Francisco, California 94080-4990

U.S.A.

and

NOVARTIS AG

Lichstrasse 35

Basel, CH-4056, Switzerland

all rights inherent to said invention and that the above mentioned assignees are therefore enabled to apply, in their own names, for the corresponding patent in Columbia.



Charles Matthew Winter

South San Francisco, California

6/11/07

Date

(Legalization required)

Acknowledged before me, this _____ day of _____, 2007

(NOTARY PUBLIC)

See attached
California
All-purpose
acknowledgment

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

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 Christine Marie Ricks
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de Christine Marie Ricks, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

5. En Sacramento, California
6. el 19no día de Junio de 2007
7. por el Secretario de Estado Encargado, Estado de California
8. No. 404592
9. Sello/Timbre

Hay un sello que dice:

10. Firma

EL GRAN SELLO DE
EL ESTADO DE CALIFORNIA

(firma)
Secretario de Estado

78
95

ACUERDO PARA TODO TIPO DE PROPÓSITOS

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

El Junio 11, 2007 , ante mi Christine Ricks, Notario Público
Fecha Nombre y Título del Funcionario (ej. "Jane Doe, Notano Público")
se presentó Charles M. Winter
Nombre(s) del Firmante(s)

Hay un sello que dice:

CHRISTINE MARIE RICKS
Comisión # 1686251
Notario Público – California
Condado de San Mateo
Mi Comisión Vence Ago. 5, 2010

Colocar sello notarial arriba

☐ personalmente conocido por mi

☒ probado ante mi en base a evidencia satisfactoria que es la(s) persona(s) cuyo nombre(s) está(n) suscrito(s) al instrumento presente y reconoció ante mi que el/ella/ellos ejecutaron la misma en su/sus capacidad(es) autorizada(s), y que por su/sus firma(s) en el instrumento las personas o la entidad en nombre de la cual la persona actuó ejecutó el instrumento.

EN TESTIMONIO, mi firma y sello oficial.

(firma)
Firma del Notario Público

OPCIONAL

Aunque la información de abajo no es requerida por la ley, puede ser valiosa para personas que cuentan con el documento y podría evitar la remoción fraudulenta de este formato y su sujeción a otro documento

Descripción del Documento Anexo
Título o Tipo de Documento: Documento de Cesión

Fecha del Documento: Junio 11, 2007 Número de Páginas: 1

Firmante(s) Además de los Nombrados Arriba: _____

Capacidad(es) Reclamada(s) por el Firmante(s)
Nombre del Firmante: Charles M. Winter

☒ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____

☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de Hecho
☐ Fiado
☐ Tutor Legal o Conservador
☐ Otro: _____

El Firmante Representa a: _____



Capacidad(es) Reclamada(s) por el
Nombre del Firmante: _____

☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____

☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de Hecho
☐ Fiado
☐ Tutor Legal o Conservador
☐ Otro: _____

El Firmante Representa a: _____



DOCUMENTO DE CESIÓN

Que se conozca que el abajo firmante

Charles Matthew Winter, de 2433 Coronet Blvd., Belmont, California 94002 EUA

declara bajo juramento que es el único y verdadero cedente de

Proceso Para la Concentración de Anticuerpos y Productos de los Mismos

basados en las solicitudes de prioridad

Serial de E.U. No. 60/609,092 Presentada el 9 de Septiembre de 2004

Serial de E.U. No. 11/220,362 Presentada el 6 de Septiembre de 2005

y que el cede sin reservas ni limitaciones a favor de

GENENTECH, INC.
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990
E.U.A.

y

NOVARTIS AG
Lichstrasse 35
Basel, CH-4056, Suiza

todos los derechos inherentes de dicha invención y que los cesionarios arriba mencionados están habilitados, por lo tanto, para solicitar bajo su propio nombre para la patente correspondiente en Colombia.

South San Francisco, California

(firma)

6/11/07

Charles Matthew Winter

(Legalización Requerida)

Reconocido ante mí, este ____ día de _____, 2007

(NOTARIO PÚBLICO)

Ver el Acuerdo para todo tipo de
propósitos de California.

29
96

AS. 103276 431

LAW OFFICES

BRIGARD & CASTRO

Carrera 7 # 71 - 21 Torre B - PISO 4

Bogotá, Colombia / South America

POWER OF ATTORNEY

The undersigned, Arthur Canonica and Sabine Zeller, legal representative of **NOVARTIS AG**, an organization existing under the laws of Switzerland, and in present execution of its business activity, domiciled at Lichstrasse 35, Basel, CH-4056, Switzerland,

hereby appoints **BRIGARD & CASTRO** domiciled at Carrera 7 # 71-21 Torre B - PISO 4 of Bogotá, Colombia, conjointly, alternatively or indistinctly as attorneys with special and sufficient powers to apply and obtain from the competent offices and authorities of Colombia Patent of Invention

Process For Concentration Of Antibodies And Therapeutic Products Thereof,

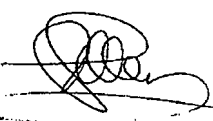
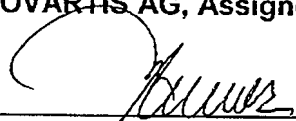
to be issued in the names of

GENENTECH, INC., domiciled at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990 U.S.A., and **NOVARTIS AG**, domiciled at Lichstrasse 35, Basel, CH-4056, Switzerland,

to whom assignment has been made of all right and title of said Patent for the territory of Colombia without any restriction. The assignee also signs these presents in token of acceptance of the said assignment and hereby authorizes the said attorneys to take all necessary steps before the said offices and authorities for the purpose above stated; to make petitions, declarations and claims and to use all means which said attorneys shall deem proper for the safeguard of the interests of the constituent. This power includes the faculties to receive, desist, renounce, compromise, transact, substitute it in all or in part, to revoke substitutions, to receive notifications and to appoint extra-judicial or judicial attorneys. The attorneys mentioned above can exercise this power alternatively or indistinctly.

Basel, June 11th 2007

NOVARTIS AG, Assignee


Name: Arthur Canonica Sabine Zeller
Title: Adm. Professionals

(Legalization required)

Acknowledged before me, this _____ day of _____, 2007

(NOTARY PUBLIC)

Attestation

I, the undersigned notary public in Basel, Switzerland, certify herewith that the above signatures are the genuine signatures of **Mr. Arthur Canonica**, citizen of Corticiasca/TI, Switzerland, residing in Wisen/SO, Switzerland, and **Ms. Sabine Zeller**, citizen of Ormalingen, Switzerland, residing in Gelterkinden, Switzerland, both acting for **Novartis AG**, in Basel, Switzerland, both as proxy holders, both with joint signature.

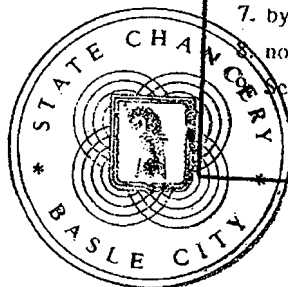
The authenticity of the signatures was established by comparison.

BASEL, Switzerland, this 13th (thirteenth) day of June 2007 (twothousandandseven).



M. Staehelin, Notar

Leg.Prot.Nr. 1027/2007



APOSTILLE (Hague Convention of October 5th, 1961)	
1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse) This official document	
2. is signed by <i>M. Staehelin</i>	
3. in his/her function as <i>off. Notar</i>	
4. and certified by the seal of the <i>Gebühren</i>	
Certified <i>13. Juni 2007</i>	
5. in Basel (Bâle)	6. on
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
8. no. <i>6639/9-980</i>	
9. seal/stamp:	
10. Signature: <i>Heidi Fischer</i>	

80
97

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **Novartis AG**, con domicilio en Lichstrausse 35, Basel, CH-4056, Suiza.

**OFICINA DE ABOGADOS
BRIGARD & CASTRO
Carrera 7 # 71 – 21 Torre B – Piso 4
Bogotá, Colombia / Suramérica**

PODER

El abajo firmante, Arthur Canonica y Sabine Zeller, representante legal de **NOVARTIS AG**, una organización existente bajo las leyes de Suiza, y en presente ejecución de su actividad de negocios, con domicilio en Lichstrausse 35, Basel, CH-4056, Suiza,

Por la presente designa a **BRIGARD & CASTRO** con domicilio en la Carrera 7 # 71 – 21 Torre B – Piso 4 de Bogotá, Colombia, conjuntamente, alternamente o indistintamente como abogados con poderes especiales y suficientes para solicitar y obtener una Patente de Invención de los funcionarios competentes y autoridades de Colombia

Proceso para la Concentración de Anticuerpos y Productos Terapéuticos del Mismo,

A ser expedida a nombre de

GENENTECH, INC., con domicilio en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990 E.U.A., y **NOVARTIS AG**, con domicilio en Lichstrausse 35, Basel, CH-4056, Suiza,

a quienes se les ha hecho la cesión de todo el derecho y título de dicha Patente para el territorio de Colombia sin restricción alguna. El cesionario también firma estas presentes como una aceptación de dicha cesión y por la presente autoriza que dichos abogados tomen todos los pasos necesarios ante dichas oficinas para el objeto descrito arriba; a hacer peticiones, declaraciones y reclamos y a utilizar todos los medios que dichos abogados puedan considerar apropiados para salvaguardar los intereses del constituyente. Este poder incluye las facultades de recibirla, desistir de ella, renunciar a ella, comprometer, realizar transacciones, sustituirla parcial o completamente, revocar sustituciones, recibir notificaciones y de designar abogados extra-judiciales o judiciales. Los abogados mencionados arriba pueden ejercer este poder alternamente o indistintamente.

Basel, Junio 11, 2007-06-29

NOVARTIS AG, Cesionario

(firma)
Nombre: Arthur Canonica Sabine Zeller
Título: Profesionales Adm.

(Legalización Requerida)

Reconocimiento ante mi, este ____ día de _____, 2007

(NOTARIO PÚBLICO)

Testimonio

Yo, el abajo firmante notario público en Basel, Suiza, certifico con la presente que las firmas de arriba son las firmas genuinas del Sr. Arthur Canonica, ciudadano de Corticiasca/TI, Suiza, residente en Wlsen/SO, Suiza, y la Srta. Sabine Zeller, ciudadana de Ormalingen, Suiza, residente en Gelterkinden, Suiza, ambos actuando para Novartis Ag, en Basel, Suiza, ambos como apoderados, ambos con firma conjunta.

La autenticidad de las firmas se establece por comparación.

BASEL, Suiza, este 13 (treceavo) día de Junio 2007 (dos mil siete).

Hay un sello que dice:

Dr. MATTHIAS STAEHELIN
NOTARIO BASEL

(firma)

APOSTILLA	
(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)	
1. Pais:	Suiza
Este documento público	
2. ha sido firmado por	M. Staehelin
3. en su función como:	(ilegible)
4. lleva el sello/timbre de:	(ilegible)
Wales, Australia	
Certificado	
5. en Basel (Bâle)	6. el 13 de Junio 2007
7. por la Cancillería Estatal de Canton Basel-Stadt	
8. No. 6'639/9'950	
9. Sello/timbre:	10. Firma
[sello]	(Firma)
Heidi Fisher	
Hay un sello que dice:	
Cancillería Estatal	
Ciudad de Basel	

81
98

Brigard & Castro
BOGOTÁ - 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 desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses; con todas las demás facultades legales necesarias.

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

Otorgado y firmado en

hoy de de 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 USA

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.

82
99

AP 77108

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by AIDA MICLAT 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 M. Rhames

Secretary of State

[Signature]



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo

SS:

On December 6, 2005

before me,

Aida Micalat Guiam

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 Micalat Guiam
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: _____

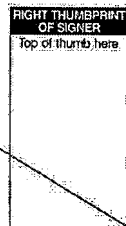
Signer(s) Other Than Named Above: _____

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: _____



83
100

93 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

84
101

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.

74. 200
7/14

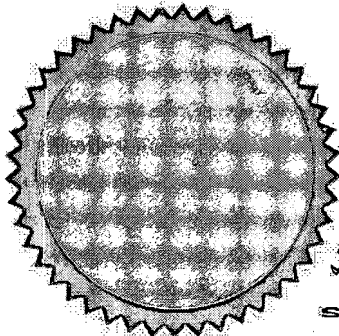
Apostille

(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. 0254030
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State

85
102

Delaware

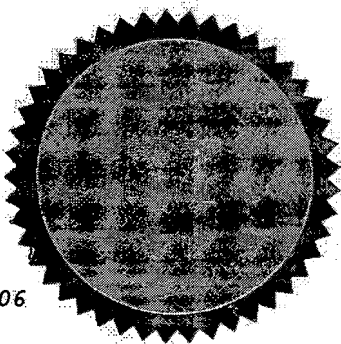
PAGE 1

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.

10

10



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.

ARTICLE 5

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

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

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

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

ARTICLE 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARTICLE 7

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

ARTICLE 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ARTICLE 9

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

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

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

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

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

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

90
107

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 ESPANOL 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 la Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede ser modificada la misma en adelante ("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 de las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

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

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Serie 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 reducirse (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.

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 período cuando los accionistas de cualquier

94
111

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 término, 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 una 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.

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

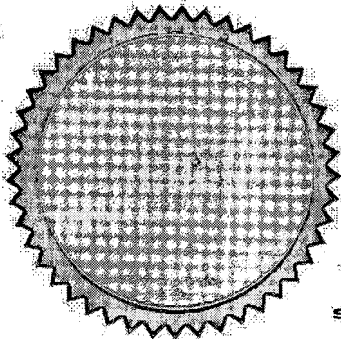
5. at Dover, Delaware

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

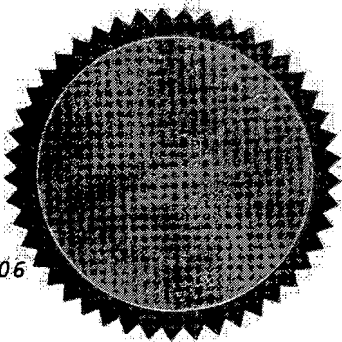
98
115

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."

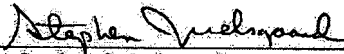
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares 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
2. Este documento público
3. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
4. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
5. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

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

NO. 11200
3/4

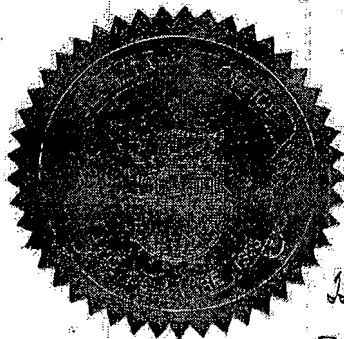
Apostille

(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:



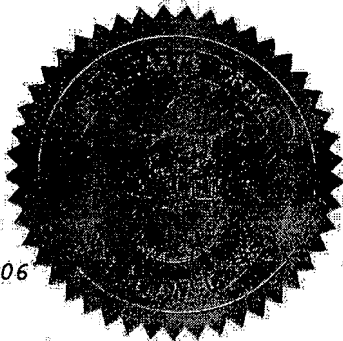
Harriet Smith Windsor
Secretary of State

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

102
119

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SERV. 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.

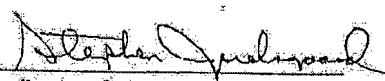
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares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

103
120

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 está 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.

104
121

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.

97-200
6/4

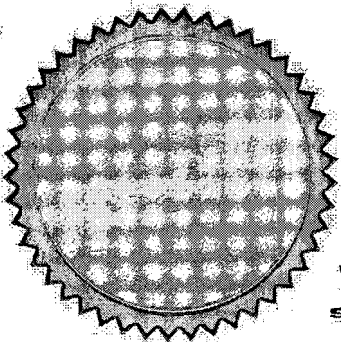
Apostille

(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. 0254032
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State

105
122

Delaware

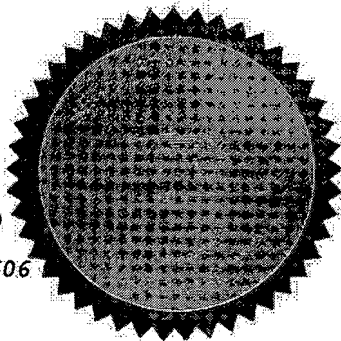
PAGE 1

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

106
123

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

Certificado

6. en Dover, Delaware
7. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
8. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
9. No. 0254032
10. Sello/timbre
11. 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

107
124

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 está 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.