

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

07-21228

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO

PROCESO PARA LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS Y PRODUCTOS

TERAPEUTICOS DE LOS MISMOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

GENENTECH, INC. v NOVARTIS, AG

DOMICILIO

SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, US ; BASEL, CH-4056, SUITZA

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

FN 09-04-2007

Cesión

PETITORIO

AS: 103.276



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-021228-00000-0000
Fec: 2007-03-02 10:20:18 Dep. 2020 NUEVEALTOSES
ITA. 11 PATENTE
Evo: 3/8 TABERNACULO
ACT 411 PRESENTACION FOLIO 240

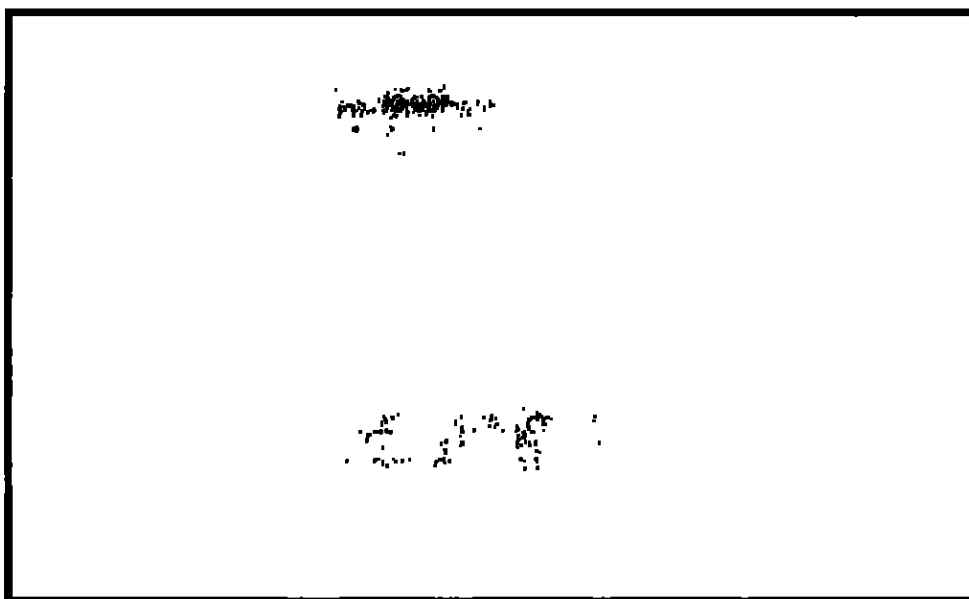
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: GENENTECH, INC. y NOVARTIS, AG Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990, US; Lichstrasse 35, Basel CH-4056, Suiza (Respectivamente) Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos y Suiza Lugar de Constitución: Estados Unidos y Suiza Teléfono: Fax: E-mail:		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Carrera 7 # 71-21 Torre B - Piso 4 Teléfono: 744-2200 Fax: 744-2700 E-mail:		IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>80.410.337</u> TP <u>57492</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Charles Matthew Winter Dirección: 2433 Coronel Blvd., Belmont, CA 94002, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2005/031844</u> Fecha <u>08-09-2005</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2006/031560 A3</u> Fecha <u>23-03-2006</u>			
6 Título (54): <u>PROCESO PARA LA CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS Y PRODUCTOS TERAPÉUTICOS DE LOS MISMOS</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u>3.7. 14. 15. 16.</u>			
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US	09-09-2004	60/609,092
	US	06-09-2005	11/220,362
9 Comprobante de pago No. <u>07-7.211</u> Fecha <u>23-02-2007</u>			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.			

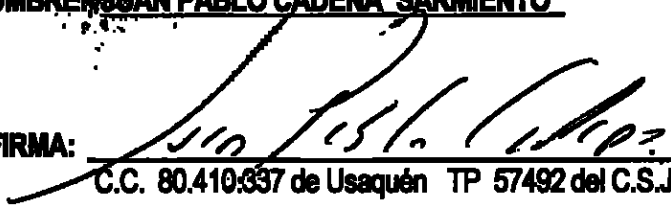
2020-F06 (01-11-15)

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$482.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia Autenticada
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: Tarjeta de Propietarios
Documentos PCT

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: 

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

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

As 102 236

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rcd: 07-021228-00000-0000
Pec: 2007-0002 10:20:10 LOP. 2007 NUEVE ALONES
Ita. 11 PATENTE IYM
Eve: 8/8 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION
FOLIO: 240

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 7,211
FECHA : ENERO 24 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	52421261	24/01/2007	6,260,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	482,000.00

CON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE ☒ PCT/US2005/031844 MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

SOLICITANTES. RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES GENENTECH, INC. y NOVARTIS, AG

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, US; BASEL, CH-4056, SUIZA

APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

TITULO PROCESO PARA LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS Y PRODUCTOS TERAPEUTICOS DE LOS
MISMOS

CLASIFICACION _____

EXPEDIENTE No. _____ FECHA DE SOLICITUD _____ ROLLO MICROFILM _____

CERTIFICADO No. _____ FECHA DE CONCESION _____ VIGENCIA DESDE _____ HASTA _____

PRORROGA _____ CAMBIO DE NOMBRE _____

TRASPASO A _____

INVENTOR (ES) CHARLES MATTHEW WINTER

OTROS _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 March 2006 (23.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/031560 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 1/34 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/031844

(22) International Filing Date:
8 September 2005 (08.09.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/609,092 9 September 2004 (09.09.2004) US
11/220,362 6 September 2005 (06.09.2005) US

(71) Applicants (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US). NOVARTIS, AG [CH/CH]; Lichstrasse 35, Basel CH-4056 (CH).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): WINTER, Charles, Matthew [US/US]; 2433 Coronet Blvd., Belmont, CA 94002 (US).

(74) Agent: BRUESS, Steven, C.; Merchant & Condit P.C., P.O. Box 2903, Minneapolis, MN 55402-0903 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

(88) Date of publication of the International search report:
24 August 2006

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

(54) Title: PROCESS FOR CONCENTRATION OF ANTIBODIES AND THERAPEUTIC PRODUCTS THEREOF

(57) Abstract: The present disclosure provides a process for concentrating proteins including an ultrafiltering, a diafiltering, and a second ultrafiltering sequence, at elevated temperatures, such as above about 30°C. The disclosure also includes a process for preparing highly concentrated antibody compositions, and highly concentrated antibody products.

WO 2006/031560 A3

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 March 2006 (23.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/031560 A2

- (51) International Patent Classification: Not classified
- (21) International Application Number:
PCT/US2005/031844
- (22) International Filing Date:
8 September 2005 (08.09.2005)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/609,092 9 September 2004 (09.09.2004) US
11/220,362 6 September 2005 (06.09.2005) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US). NOVARTIS, AG [CH/CH]; Lichstrasse 35, Basel CH-4056 (CH).
- (72) Inventor, and
(73) Inventor/Applicant (for US only): WINTER, Charles, Matthew [US/US]; 2433 Coronet Blvd., Belmont, CA 94002 (US).
- (74) Agent: BRUESS, Steven, C.; Merchant & Gould P.C., P.O. Box 2903, Minneapolis, MN 55402-0903 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PROCESS FOR CONCENTRATION OF ANTIBODIES AND THERAPEUTIC PRODUCTS THEREOF

(57) Abstract: The present disclosure provides a process for concentrating proteins including an ultrafiltering, a diafiltering, and a second ultrafiltering sequence, at elevated temperatures, such as above about 30°C. The disclosure also includes a process for preparing highly concentrated antibody compositions, and highly concentrated antibody products.

WO 2006/031560 A2

PROCESS FOR CONCENTRATION OF ANTIBODIES AND THERAPEUTIC PRODUCTS THEREOF

5

Background

Methods for isolating, purifying, and concentrating biological materials are known and include, for example, chromatography, ultrafiltration, and lyophilization, see generally, R. Hatti-Kaul et al., "Downstream Processing in Biotechnology," in *Basic Biotechnology*, Chap. 9, pages 187-211, 2nd ed., Cambridge University Press
10 (2001). Processes for making concentrated monoclonal antibody preparations for administration to humans are known, see for example, U.S. Patent No. 6,252,055, which uses ultrafiltration and which re-circulates the resulting filtrate.

Some challenges associated with available antibody concentration methods include, for example, low fluxes, long process times, large membrane areas,
15 mechanical recovery yield and losses, operator-intensive intervention or handling, low mass transfer rates, energy inefficiencies, and hydraulic pressure limits on concentration equipment. These and other challenges can contribute to a high total cost of manufacture and ultimately higher costs to therapeutic drug consumers.

There is a need for improved processes for preparing highly concentrated
20 protein formulations, such as liquid antibody preparations and therapeutic products thereof.

Summary

In general terms, the present disclosure generally relates to processes for
25 concentrating proteins, such as processes for concentrating an antibody preparation, pharmaceutical formulations containing such a preparation, and their use in human therapy or animal therapy.

In embodiments the present disclosure provides processes for preparing highly concentrated proteins, such as antibody preparations; and therapeutic
30 products prepared by the process, such as therapeutic antibody products. Accordingly, the present disclosure provides, a process for concentrating proteins comprising: a first ultrafiltering of a first antibody preparation to provide a second antibody preparation; a diafiltering the second antibody preparation to provide a diafiltered intermediate antibody preparation; and a second ultrafiltering of the
35 diafiltered intermediate antibody preparation to provide a third antibody preparation, wherein one or more of the first ultrafiltering, the second ultrafiltering, and the

diafiltering are accomplished at elevated temperatures, for example, from about 30°C to about 50°C.

5 The present disclosure also provides, in embodiments, a process for concentrating proteins comprising: a first ultrafiltering of a first protein mixture to provide a second protein mixture; a diafiltering the second protein mixture to provide a diafiltered protein mixture; and a second ultrafiltering of the diafiltered protein mixture to provide a third protein mixture, wherein one or more of the first ultrafiltering, the diafiltering, and the second ultrafiltering are accomplished at, for
10 example, about 45°C.

The present disclosure also provides, in embodiments, a highly concentrated antibody composition prepared by the above processes.

Brief Description of the Drawings

15 FIG. 1 illustrates an apparatus for accomplishing the preparative process, in embodiments of the present disclosure.

FIGS. 2 through 17 illustrate various observed or measured process values over various phases or mode of the process, in embodiments of the present disclosure.

20 FIGS. 18 and 19 illustrate the effect of elevated temperature on product quality, in embodiments of the present disclosure.

FIGS. 20 and 21 illustrate the effect of elevated temperature on bioburden control, in embodiments of the present disclosure.

25 FIG. 22 illustrates the effect of elevated temperature on process flux and process time, in embodiments of the present disclosure.

FIGS. 23 through 25 illustrates various observed or measured process values over various phases or mode of the scaled-up process, in embodiments of the present disclosure.

Detailed Description

30 Various embodiments of the present disclosure will be described in detail with reference to drawings, if any. Reference to various embodiments does not limit the scope of the invention, which is limited only by the scope of the claims attached hereto. Additionally, any examples set forth in this specification are not intended to be limiting and merely set forth some of the many possible embodiments for the
35 claimed invention.

The following are used, unless otherwise described:

5 "Ultrafiltering," "ultrafiltration," "ultrafiltered," "UF," and like terms refer to, for example, using synthetic semi-permeable membranes, with appropriate physical and chemical properties, to discriminate between molecules in the mixture, primarily on the basis of molecular size and shape, and accomplish separation of different molecules or accomplish concentration of like molecules.

10 "Diafiltering," "diafiltration," "diafiltered," "diafiltrating," "DF," and like terms refer to, for example, using an ultrafiltration membrane to remove, replace, or lower the concentration of salts or solvents from solutions or mixtures containing proteins, peptides, nucleic acids, or other biomolecules.

15 "Transmembrane pressure" or "TMP" refers to the average applied pressure from the feed to the filtrate side of the membrane calculated as $TMP [bar] = [(P_F + P_R)/2] - P_f$, where P_F is the feed pressure, P_R is the retentate pressure, and P_f is the filtrate pressure.

"Tangential flow filtration," "cross flow filtration," "TFF," and like terms refer to a mode of filtration in which the solute-containing solution passes tangentially across the UF membrane and lower molecular weight salts or solutes are passed through by applying pressure.

20 "Antibody" is used in the broadest sense and specifically covers intact monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies) formed from at least two intact antibodies, and antibody fragments, so long as they exhibit the desired biological activity. An antibody is a protein generated by the immune system that is capable of recognizing and binding to a specific antigen. Described in terms of its structure, an antibody is a Y-shaped protein consisting of four amino acid chains, two heavy and two light. In a simplified model sufficient for this appeal, each antibody has primarily two regions: a variable region and a constant region. The variable region, located on the ends of the arms of the Y, binds to and interacts with the target antigen. This variable region includes a complementary determining region (CDR) that recognizes and binds to a specific binding site on a particular antigen. The constant region, located on the tail of the Y, is recognized by and interacts with the immune system (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York). A target antigen generally has numerous binding sites, also called epitopes, recognized by CDRs on multiple antibodies. Each antibody that

35

specifically binds to a different epitope has a different structure. Thus, one antigen may have more than one corresponding antibody.

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

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

The term "variable" refers to the fact that certain segments of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies. The V domain mediates antigen binding and define specificity of a particular antibody for its particular

antigen. However, the variability is not evenly distributed across the approximately 110-amino acid span of the variable domains. Instead, the V regions consist of relatively invariant stretches called framework regions (FRs) of 15-30 amino acids separated by shorter regions of extreme variability called "hypervariable regions" that are each 9-12 amino acids long. The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FRs, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three hypervariable regions, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The hypervariable regions in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the hypervariable regions from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.*, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

The term "hypervariable region" when used herein refers to the amino acid residues of an antibody which are responsible for antigen-binding. The hypervariable region generally comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (e.g., around about Kabat residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the V_L , and around about Kabat residues 31-35B (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the V_H (see Kabat *et al.*, *supra*) and/or those residues from a "hypervariable loop" (e.g., around about Chothia residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the V_L , and 26-32 (H1), 52A-55 (H2) and 96-101 (H3) in the V_H (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)).

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical and/or bind the same epitope(s), except for possible variants that may arise during production of the monoclonal antibody, such variants generally being present in minor amounts. Such monoclonal antibody typically includes an antibody comprising a polypeptide sequence that binds a target, wherein the target-binding polypeptide sequence was obtained by a process that includes the selection of a single target binding polypeptide sequence from a plurality of polypeptide sequences. For example, the selection process can be the

selection of a unique clone from a plurality of clones, such as a pool of hybridoma clones, phage clones or recombinant DNA clones. It should be understood that the selected target binding sequence can be further altered, for example, to improve affinity for the target, to humanize the target binding sequence, to improve its production in cell culture, to reduce its immunogenicity *in vivo*, to create a multispecific antibody, *etc.*, and that an antibody comprising the altered target binding sequence is also a monoclonal antibody of this invention. In contrast to polyclonal antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody of a monoclonal antibody preparation is directed against a single determinant on an antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibody preparations are advantageous in that they are typically uncontaminated by other immunoglobulins. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by a variety of techniques, including, for example, the hybridoma method (*e.g.*, Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), recombinant DNA methods (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567), phage display technologies (*see, e.g.*, Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); and Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), and technologies for producing human or human-like antibodies in animals that have parts or all of the human immunoglobulin *loci* or genes encoding human immunoglobulin sequences (*see, e.g.*, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits, *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann, *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,591,669 (all to GenPharm); 5,545,807; WO 1997/17852; U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016; Marks, *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992);

Lonberg, *et al.*, Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994); Fishwild, *et al.*, Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); and Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995).

"Chimeric" antibodies (immunoglobulins) have a portion of the heavy and/or light chain identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Humanized antibody as used herein is a subset of chimeric antibodies.

"Humanized" forms of non-human (*e.g.*, murine) antibodies are chimeric antibodies which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient or acceptor antibody) in which hypervariable region residues of the recipient are replaced by hypervariable region residues from a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues which are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance such as binding affinity. Generally, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin sequence although the FR regions may include one or more amino acid substitutions that improve binding affinity. The number of these amino acid substitutions in the FR are typically no more than 6 in the H chain, and in the L chain, no more than 3. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin.

For further details, see Jones, *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann, *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (see U.S. Patent No. 5,641,870, Example 2; Zapata, *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, and a residual "Fc" fragment, a designation reflecting the ability to crystallize readily. The Fab fragment consists of an entire L chain along with the variable region domain of the H chain (VH), and the first constant domain of one heavy chain (CH1). Each Fab fragment is monovalent with respect to antigen binding, *i.e.*, it has a single antigen-binding site. Pepsin treatment of an antibody yields a single large F(ab')₂ fragment which roughly corresponds to two disulfide linked Fab fragments having divalent antigen-binding activity and is still capable of cross-linking antigen. Fab' fragments differ from Fab fragments by having additional few residues at the carboxy terminus of the CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')₂ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

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

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and -binding site. This fragment consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable region domain in tight, non-covalent association. From the folding of these two domains emanate six hypervariable loops (3 loops each from the H and L chain) that contribute the amino acid residues for antigen binding and confer antigen binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has

the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

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

"About" modifying, for example, the quantity of an ingredient in the compositions, concentration of an active, buffer volumes, diavolumes, pore size, apparent molecular, molecular weight cut-off, process temperature, process time, yields, flow rates, pressures, bio-burdens, and like values, and ranges thereof, employed in the methods of the invention, refers to variation in the numerical quantity that can occur, for example, through typical measuring and handling procedures used for making concentrates or use solutions; through inadvertent error in these procedures; through differences in the manufacture, source, or purity of the ingredients employed to make the compositions or carry out the methods; and like considerations. The term "about" also encompasses amounts that differ due to aging of a composition with a particular initial concentration or mixture. The term "about" also encompasses amounts that differ due to mixing or processing a composition with a particular initial concentration or mixture. Whether or not modified by the term "about" the claims include equivalents to the quantities.

"Consisting essentially of" refers to a process of obtaining a concentrated protein composition or antibody composition that includes the steps and ingredients listed in the claim, plus other steps and ingredients that do not materially affect the basic and novel properties of the composition, such as a multiplicity of steps or buffer media. Ingredients that materially affect the basic properties of the composition and method of the present disclosure impart undesirable characteristics including, for example, bio-burden, such as the undesirable toxicity or irritability associated with contaminants.

The indefinite article "a" or "an" and its corresponding definite article "the" as used herein is understood to mean at least one, or one or more, unless specified otherwise.

The present disclosure provides, in embodiments, the abovementioned processes and the concentrated antibody products thereof.

5 In embodiments of the present disclosure, the preparative processes and products thereof can be used in preparing highly concentrated antibody preparations and similar preparations, such as purifying and concentrating proteins or like substances from natural or synthetic sources, and which products can be useful for treating pathological conditions, such as asthma, cancer, psoriasis, inhibiting angiogenesis, and like pathological conditions.

10 In embodiments of the above-mentioned process for preparing highly concentrated antibody compositions of the disclosure, the following further exemplifies how to make and use the preparative processes and products of the disclosure.

15 In embodiments of the present disclosure, there is provided a process for preparing highly concentrated antibody compositions, for example, according to accomplishing the following steps in the order recited, comprising:

20 a first ultrafiltering of a first antibody preparation, having a concentration of, for example, about 0.1 to about 10 grams per liter (g/L), to provide an second antibody preparation as the retentate, having a greater antibody concentration of, for example, about 10 to about 50 grams per liter;

a diafiltering of the resulting second antibody preparation to provide a diafiltered intermediate antibody preparation as the retentate, having about the same concentration as the resulting second antibody preparation retentate, that is, diafiltering to accomplish a buffer exchange at constant volume; and

25 a second ultrafiltering of the diafiltered intermediate antibody preparation to provide a third antibody preparation as the retentate, having a greater antibody concentration of, for example, about 150 to about 200 grams per liter.

The preparative processes of the disclosure can further comprise an optional product recovery step or steps, for example, and as disclosed and illustrated herein.

30 In embodiments of the above-mentioned process of the disclosure, one or more of the first ultrafiltering, the diafiltering, and the second ultrafiltering, can be accomplished at, for example, from about 30 °C to about 70°C. In embodiments, these steps can also be accomplished at, for example, from about 30 °C to about 50°C. In embodiments, these steps can also be accomplished at, for example, from
35 about 35 °C to about 50°C. In embodiments, these steps can also be accomplished

at, for example, about 45 °C, such as from about 45 °C plus or minus 5°C. Depending upon the type of antibody preparation, for processes accomplished at temperatures above about 70°C, the preparation may show signs of deterioration, such as denaturation, agglomeration, and like phenomena. For processes accomplished at temperatures below from about 30 to about 35°C, the flow rates are typically undesirably low and process times are undesirably long, making the process at lower temperatures less attractive for efficient commercial production.

In embodiments, the first antibody preparation can have an antibody concentration of, for example, from about 0.1 to about 100 grams per liter (g/L). The antibody concentration is, for example, a common concentration typically available from other preliminary protein or antibody purification steps or methods, such as, centrifugation, filtration, chromatography, and like procedures. The resulting second antibody preparation obtainable from the first ultrafiltering can have an antibody concentration of, for example, from about 10 to about 50 grams per liter, and for example, about 20 to about 40 grams per liter, such as 30 grams per liter. A range for the antibody concentration of the intermediate antibody preparation can depend upon, for example, a balance of factors, such as sample volume and sample flux achievable with a particular buffer containing the second antibody preparation. The intermediate antibody preparation can have an antibody concentration of, for example, about 25 to about 35 grams per liter and the third antibody preparation can have an antibody concentration of, for example, from about 170 to about 200 grams per liter. The third antibody preparation, in embodiments, can have an antibody concentration of, for example, from about 50 to about 250 grams per liter, such as from of about 100 to about 230 grams per liter, and from about 170 to about 200 grams per liter, such as 185 grams per liter.

It will be apparent to one skilled in the art, upon comprehending the present disclosure, that the intermediate antibody preparation and third antibody preparation comprise the same ultra-filtered retentate except for, for example, differences in the antibody concentration resulting from the first and second ultrafiltering concentration, and differences in the suspending buffer media resulting from the diafiltration buffer exchange. Thus, there is little, if any, compositional change, such as degradation, of the target protein or antibody product, in embodiments of the present disclosure.

Conventional ultrafiltration concentration methods can have generally greater time and lesser through-put inefficiencies having considerably longer process times such as several days to several weeks, process considerably smaller volumes, or both.

In embodiments, the protein concentration process of the disclosure can be accomplished in, for example, from about 1 to 10 hours, preferably in from about 2 to 5 hours, and more preferably in about 3 hours. The preferences favor higher flux through-put and smaller membrane areas.

In embodiments, the first ultrafiltering can be accomplished, for example, in about 35 percent of the total process time. Thus, for example, in a concentration and purification process of the disclosure with about 3 hours total process time, the first ultrafiltering can be accomplished in about 45 minutes. In embodiments, the second ultrafiltering can be accomplished, for example, in about 15 percent of the total process time. Thus, for example, in a process of the disclosure with about 3 hours total process time, the second ultrafiltering can be accomplished in about 15 minutes. The diafiltering can be accomplished, for example, in about 50 percent of the total process time. Thus, for example, in a process of the disclosure with about 3 hours total process time, the diafiltering can be accomplished in from about 90 to about 120 minutes.

In embodiments, the first ultrafiltering and the second ultrafiltering can be accomplished, for example, with an ultra-filter membrane having a nominal pore size, or molecular weight cut-off, of about 5 to about 50 kiloDaltons. Another suitable nominal pore size is, for example, from about 10 to about 40 kiloDaltons. Yet another suitable nominal pore size, or molecular weight cut-off, is about 30 kiloDaltons.

In embodiments, the first antibody preparation can contain, for example, an antibody having an apparent molecular weight of, for example, about 100 to about 200 kiloDaltons. In other embodiments, the first antibody preparation can contain an antibody having an apparent molecular weight of, for example, about 150 kiloDaltons, such as when the antibody preparation comprises anti-IgE antibodies or IgE, see for example, U.S. Patent No. 6,172,213 assigned to Genentech, Inc.

Other antibodies suitable for use in the present disclosure include cancer treating antibodies, see generally, for example: 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; and PCT/US02/33050. Still other antibodies suitable for use in the present disclosure include an anti-CD20 antibody and like antibodies including human, non-human, murine, hybrid, and chimeric forms. See for example U.S. Patent No. 6,582,959 (VEGF) and U.S. Patent Application No. 2002/0122797 A1 (human VEGF).

In embodiments, antibodies included within the scope of the disclosure include hybrid and recombinant antibodies (e.g., "humanized" and "human" antibodies) regardless of species of origin or immunoglobulin class or subclass designation, as well as antibody fragments (for example, Fab, F(ab')₂, and F_v). See U.S. Pat. No. 4,816,567; Mage and Lamoyi, in *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987).

Monoclonal antibodies may also be used and can be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson et al (1991) *Nature*, 352:624-628 and Marks, et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, for example. Monoclonal antibodies include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Pat. No. 4,816,567; and Morrison, et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855). Chimeric antibodies can include "primatized" antibodies comprising variable domain antigen-binding sequences derived from a non-human primate (e.g., Old World Monkey, Ape etc) and human constant region sequences.

Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations that include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized uncontaminated by other antibodies. Thus, the modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from such a substantially homogeneous population of antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring



mutations that may be present in minor amounts, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies for use in the disclosure may be made using the hybridoma method first described by Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods. Other known methods of antibody production are described, for example, in Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103, Academic Press (1986); Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984). Brodeur, et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-10 63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987).

Various methods have been employed to produce monoclonal antibodies (MAbs). Hybridoma technology, which refers to a cloned cell line that produces a single type of antibody, uses the cells of various species, including mice (murine), hamsters, rats, and humans. Another method to prepare MAbs uses genetic engineering including recombinant DNA techniques. Monoclonal antibodies made from these techniques include, among others, chimeric antibodies and humanized antibodies. A chimeric antibody combines DNA encoding regions from more than one type of species. For example, a chimeric antibody may derive the variable region from a mouse and the constant region from a human. A humanized antibody comes predominantly from a human, even though it contains nonhuman portions. Like a chimeric antibody, a humanized antibody may contain a completely human constant region. But unlike a chimeric antibody, the variable region may be partially derived from a human. The nonhuman, synthetic portions of a humanized antibody often come from CDRs in murine antibodies. In any event, these regions are crucial to allow the antibody to recognize and bind to a specific antigen.

As noted, murine antibodies play an important role in antibody technology. While useful for diagnostics and short-term therapies, murine antibodies cannot be administered to people long-term without increasing the risk of a deleterious immunogenic response. This response, called Human Anti-Mouse Antibody (HAMA), occurs when a human immune system recognizes the murine antibody as foreign and attacks it. A HAMA response can cause toxic shock or even death. Chimeric and humanized antibodies reduce the likelihood of a HAMA response by minimizing the nonhuman portions of administered antibodies. Furthermore, chimeric and humanized antibodies have the additional benefit of activating

secondary human immune responses, such as antibody dependent cellular cytotoxicity.

5 An "intact" antibody is one that comprises an antigen-binding variable region as well as a light chain constant domain (CL) and heavy chain constant domains, CH1, CH2 and CH3. The constant domains may be native sequence constant domains (e.g., human native sequence constant domains) or amino acid sequence variant thereof. The intact antibody may have one or more "effector functions" which refer to those biological activities attributable to the Fc region (a
10 native sequence Fc region or amino acid sequence variant Fc region) of an antibody. Examples of antibody effector functions include C1q binding; complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (e.g., B cell receptor, BCR), etc.

15 Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, intact antibodies can be assigned to different "classes." There are five major classes of intact antibodies: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into "subclasses" (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different
20 classes of antibodies are called α , δ , ϵ , γ , and μ , respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

In embodiments, the first ultrafiltering concentrates the first antibody preparation to provide the second antibody preparation having an antibody
25 concentration of about 30 grams per liter, and the second ultrafiltering concentrates the intermediate antibody preparation (obtained from diafiltering) to provide the third antibody preparation having an antibody concentration of, for example, about 170 to about 200 grams per liter. The first ultrafiltering and the second ultrafiltering can be accomplished with the same ultra-filter membrane, and if desired, within the
30 same vessel or process circuit, for example, to minimize handling, losses, leakage, and like impacts on yield, efficiency, and economy. The first ultrafiltering and the second ultrafiltering can be accomplished with any suitable ultrafilter apparatus or ultrafilter membrane. Many suitable ultrafilter apparatus and ultrafilter membranes, which are capable of tangential flow filtration (TFF) operation to accomplish the
35 ultrafiltrations and diafiltration, are commercially available, such as from Millipore,

Pall Corp., Sartorius, and like vendors. In embodiments, a suitable ultra-filter membrane can be, for example, any regenerated cellulose composite, which composite has a relatively low protein adsorption profile compared to other available
5 ultra-filter membranes, such as, polyethersulfone.

The diafiltering operation exchanges a first buffer composition present in the first and second antibody preparations for a second buffer desired in the third antibody preparation. In embodiments, the first buffer can comprise, for example, a mixture of aqueous sodium chloride and a TRIS buffer, and the second buffer can
10 comprise, for example, a mixture of aqueous histidine chloride and arginine chloride. The diafiltering can accomplish a buffer exchange at constant volume, constant concentration, or both. In embodiments, the diafiltering accomplishes a buffer exchange at constant volume and constant concentration. The diafiltering can accomplish a buffer exchange, for example, of from about 5 to about 15 fold
15 volumes (i.e. diavolumes). The diafiltering can also accomplish a buffer exchange, for example, of about 8-fold volumes (8 diavolumes), that is, 8 times the volume of the sample containing the antibody preparation to be exchanged. For example, a 10 liter antibody preparation can be diafiltered with a 5 fold (diavolumes) or 50 liter volume of exchange buffer. The exchange volume and preferences for exchange
20 volumes considers a balance of factors, for example, process through-put efficiencies, product purity, governmental and customer-patient acceptability standards, and like standards, and can depend on, for example, the concentration and type of buffer (e.g., the first buffer) in the first antibody preparation, and like considerations.

25 The first ultrafiltering, the second ultrafiltering, and the diafiltering are preferably accomplished with tangential flow filtration (TFF mode) across an ultra-filter membrane, and the ultra-filter membrane is preferably the same membrane for each step. The yield of product in the final pool (i.e., the third antibody preparation) can be, for example, greater than about 70 weight percent, such as from about 80 to
30 about 100 weight percent based on the weight of antibodies in the first antibody preparation. The yield of the third antibody preparation can be, in embodiments, greater than about 90 weight %, in embodiments, greater than about 95 weight percent, and in embodiments, even greater than about 98 weight %, based on the weight of antibodies in the first antibody preparation.

The first ultrafiltering can have a recirculation rate of, for example, from about 50 to 1,000 mL/min, and preferably from about 100 to 1,000 mL/min. The recirculation rate can be scaled in accordance with the available membrane area, for example, membrane areas of 5, 20, 200, 1,000 square feet, and like areas permit increasingly higher recirculation rates. Thus, a suitable scaled recirculation rate, in embodiments, can be, for example, from about 0.5 L/min/ft² to about 5 L/min/ft². The ultrafiltering and diafiltrating can be accomplished, for example, at transmembrane pressures of from about 5 to about 50 p.s.i. The ultrafiltering and diafiltrating can be accomplished, for example, at transmembrane pressures of from about 10 to about 50 p.s.i. In embodiments of the present disclosure there is provided a process for preparing an antibody concentrate for a more dilute antibody formulation, the antibody concentrate having a minimum bio-burden, for example, of less than or under a detectable limit, such as, less than about 100 CFU/mL.

Antibody compositions of the disclosure can be, for example, concentrated monoclonal antibody preparation for administration to humans, such as at a concentration of greater than or equal to about 100 g/L (mg/mL), such as about 120 to about 170 g/L.

The antibody compositions of the disclosure can be, for example, immunoglobulins, such as from the group IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM; sub-classes thereof; recombinants thereof; fragments thereof; and mixtures thereof of any of the foregoing. A preferred antibody composition of the disclosure includes recombinant humanized anti-IgE antibodies. The antibody compositions of the disclosure can include a buffer. A preferred buffer can be, for example, a mixture of aqueous histidine chloride and arginine chloride.

The preparative processes of the disclosure are preferably accomplished in the same apparatus and without operator intervention or with minimal operator intervention, for example, as illustrated in FIG. 1.

The first antibody preparation can be provided or prepared using a variety of chemical, physical, mechanical or non-mechanical, or biochemical methods, such as, grinding, ultrasonication, homogenization, enzymatic digestion, solvent extraction, centrifugation, chromatography, and like methods, and combinations thereof, see for example, the above mentioned R. Hatti-Kaul et al., "Downstream Processing in Biotechnology," in *Basic Biotechnology*, Chap. 9. The third antibody preparation can be further processes, if desired, using for example, nanofiltration (to remove,

24

e.g., divalent ions), reverse osmosis (to remove, e.g., monovalent ions), and like liquid purification methods. The third antibody preparation of the present disclosure can be packaged, stored, or directly used. The third antibody preparation can be
5 further processed, if desired, using for example, additional concentration steps, such as drying, lyophilization, lyophilization-reconstitution, and like methods. The resulting concentrated third antibody product can be reconstituted at a later time, if desired, with a suitable liquid.

Referring to the figures, FIG. 1 illustrates an apparatus, in embodiments of
10 the present disclosure, for accomplishing the preparative process including an ultrafiltration-difiltration system (100) having an TFF ultra-filtration-difiltration (UF-DF) unit (110), having a UF-DF membrane (115), which is in communication with recirculation tank (120) which tank serves as a main feed and retentate
15 reservoir. In embodiments, tank (120) can have a temperature control system comprising, for example, an insulating jacket (125), a thermostatic or temperature controlled heating element (126), such as a rheostat resistive heater element or a circulating heated liquid system which includes a heater (not shown), a flow regulator (127), such as a recirculating pump, and a suitable heat transfer fluid, such
20 as either water, glycols, or mixtures thereof. All in-circuit components or component contributing to in-circuit flow or processing, such as pipes, valves, pumps, tanks, and like components, can be optionally insulated or optionally adapted for external heating to maintain close control over temperature specifications and to avoid temperature excursions in the recirculating fluid loop
25 within and between filter chamber (110) and recirculation tank (120). In embodiments, for example, when the system (100) is accomplishing the first ultrafiltration or first ultrafiltering, such as in a fed-batch mode, the system can include an optional feed tank (128) which is in fluid communication with recirculation feed tank (120) and can be used to, for example, make-up, replenish, or supplement the depleted liquid phase from recirculation tank (120).

30 A pump (130) pumps feed liquid from tank (120) through the UF/DF unit (110) and thereafter recirculates the resulting retentate (the non-filtered or membrane excluded portion of the feed liquid) to recirculating tank (120). A second tank (140) holds and optionally pumps (not shown) a buffer into the main circuit (110-120 loop) during the constant volume diafiltration. For example, the addition
35 rate and volume of the buffer introduced into the main circuit is preferably at the

same rate and volume at which filtrate leaves the main circuit through membrane (115). Buffer tank (140) can be optionally insulated with jacket (143) and can include the equivalent of the abovementioned heating element and a recirculating pump (not shown). An optional inert gas source (145), such as nitrogen, or other compressed gas sources can be used, for example, for product recovery, to pressurize the retentate return, exclude oxygen, for flushing, for cleaning, for membrane integrity testing, and like operations. A third tank (160) is used to collect and recover the filtrate exiting the unit (110). Valves (150, 170) can be used as appropriate to regulate the direction and optionally the liquid flow rate in the system. All valves and pumps can be actuated manually, by coordinated computer control, or both. An optional forth tank (190) and exit stream can provide an ancillary waste-flush, product recovery, or monitoring system, for example, when equipped with an optional monitoring device (180), such as an optical density meter, optional filter(s) (185) such as a guard filter, product filter, and like optional subsystems. In embodiments, the main fluid circuit (110-120 loop) can optionally be equipped with an in-line monitoring system.

The concentrated antibody preparations prepared by processes of the present disclosure can be used for human therapeutic administration, including immunoglobulin products, for either intramuscular (IMIG) or intravenous (IVIG) administration. The concentrated antibody preparations of the disclosure can include a stabilizer, for example, a buffered amino acid salt solution, simple sugars, or like stabilizers, suitable ions chelators, such as EDTA or citrate ion, and combinations thereof, see for example, Wang, Y.-C. J. et al, "Parenteral formulations of proteins and peptides: stability and stabilizers," *J. Parenteral Sci. Technol.*, 42, Suppl. S3-S26 (1988). Derwent Abstract of JP01268646A (AN89-359879) reports that the application describes an injection preparation of an IgG₃ monoclonal antibody having a concentration of 0.1 micrograms/mL to 100 mg/mL. Subject matter disclosed in these publications is believed to be outside the scope of the present disclosure.

Preparations according to the disclosure can be substantially free from aggregates. Acceptable levels of aggregated contaminants would be less than, for example, about 5 weight %, and ideally less than 2 weight %. Levels as low as 0.2 weight % can be achieved, although aggregated contaminants of about 1 weight % is more typical. The preparation in embodiments, can also preferably be free from

26

excipients traditionally used to stabilize polyclonal formulations, for example glycine and/or maltose.

5 The present disclosure can provide a monoclonal antibody preparation for administration to a human characterized in that the antibody in the preparation is a recombinant antibody and can be at a concentration of 100 mg/mL or greater, preferably greater than 150 mg/mL. The preparation is preferably substantially free from of any protein aggregation.

10 The pH of pharmaceutical formulations of the disclosure will depend upon the particular route of administration. However, in order to maximize the solubility of the antibody in the concentrated solution, the pH of the solution should be different from the pH of the isoelectric point (pI) of the antibody.

15 In embodiments of the disclosure, the monoclonal preparation can be envisaged for use in human therapy. Various human disorders can be treated such as cancer or infectious diseases, for example, those mentioned above, and immune dysfunction such as T-cell-mediated disorders including severe vasculitis, rheumatoid arthritis, systemic lupus, also autoimmune disorders such as multiple sclerosis, graft versus host disease, psoriasis, juvenile onset diabetes, Sjogrens' disease, thyroid disease, myasthenia gravis, transplant rejection, inflammatory bowel
20 disease, asthma, IgE mediated disorders, and like disorders or conditions, or combinations thereof.

The disclosure therefore provides in embodiments the use of a concentrated monoclonal antibody preparation as described herein in the manufacture of medicament for the treatment of any of the aforementioned disorders, and like
25 disorders. Also provided is a method of treating a human being, having any such disorder, comprising administering to the individual a therapeutically effective amount of a preparation according to the disclosure. The dosages of such antibody preparations will vary with the conditions being treated and the recipient of the treatment, but can be, for example, in the range of about 50 to about 2,000 mg for an
30 adult patient preferably about 100 to about 1,000 mg administered daily or weekly for a period between 1 and 30 days, and repeated as necessary. The doses may be administered as single or multiple doses.

Process Description. The formulation step typically exchanges the purified bulk
35 drug substance, for example, resulting from ion-exchange chromatography, into the

final excipient composition and concentration. There was typically no purification achieved at this step except for small molecule removal. The emphasis was on high yield, buffer exchange, and formulation step robustness. During formulation via TFF (tangential flow filtration), the protein-containing feed solution was pumped through the membrane system and back to the recycle (recirculation) vessel. The TFF membrane retained the protein (as part of the retentate) while the filtrate (or permeate) was driven through the membrane by pressure. The pressure is called the transmembrane pressure (TMP) and is typically controlled using a retentate pressure control valve. The process was usually achieved by a sequence of a first ultrafiltering (concentration), diafiltering (constant volume buffer exchange), and a second ultrafiltering (further concentration). The number of diavolumes (volumetric equivalents) necessary to remove process buffer components can be readily calculated or determined experimentally.

UF/DF Process Generally for anti-IgE. The pH of an anion-exchange pool from chromatography was adjusted to a pH of about 6 using 0.5 M aqueous phosphoric acid. The pH adjusted anion-exchange pool was formulated by ultrafiltration/diafiltration (UF/DF) process of the present disclosure using a membrane having a nominal molecular cut off of 10,000 - 30,000 Daltons. Prior to processing, the UF membrane was equilibrated with diafiltration buffer (0.02 M histidine, 0.2 M arginine-HCl, pH 6).

The product from an anionic exchange (anion-exchange pool) was then loaded on the system and was concentrated to an intermediate concentration by the first ultrafiltering. The pool was then diafiltered (8 X or diavolumes) into its formulation (0.02 M histidine, 0.2 M arginine-HCl, pH 6). The pool was then concentrated by a second ultrafiltering to a final bulk concentration of >170g/L and recovered through a 0.22 micrometer sterile filter. The entire UF/DF process was performed at a temperature set point of about 45 degrees C. This temperature control was achieved using temperature control of the incoming anion-exchange pool, the diafiltration buffer, and the use of a jacketed recirculation vessel for the UF/DF process as illustrated herein.

After UF/DF, the recovered pool was diluted (i.e., conditioned) to a bulk concentration of about 150 g/L in 0.02 M histidine, 0.2 M arginine-HCl, 0.04% polysorbate-20, pH 6 (final formulation). During the conditioning steps the

temperature of the bulk was allowed to return to ambient temperature. After conditioning, the formulated bulk was again recovered through a 0.22 micrometers sterile filter.

- 5 The UF/DF system can be regenerated with 0.1 N sodium hydroxide and sanitized with 1.4% Minncare.[®] When not in use the system can be stored in 0.1N aqueous sodium hydroxide. The UF/DF membranes can be stored, for example, in a 0.1% Roccal[®]/20 % glycerol-water solution between campaigns.

10 General Ultrafiltration/Diafiltration Process Procedures

Operating Parameters: Feed flow rate at 0.5 L/min/ft². A constant retentate pressure (e.g., 10 psig) control was used for cleaning and pre-use equilibration, whereas C_{wall} , constant retentate pressure or constant TMP was used for processing.

- Pre-Use Equilibration: The following preparations were accomplished on
15 cleaned Pellicon-2 cassette membranes prior to use to assure the membranes were properly equilibrated.

<u>Volume (L/ft²)</u>	<u>Solution (room temp)</u>	<u>Mode</u>
-	-	SPFO
1.0	WFI	SPFO
1.0	DF buffer	SPFO
0.5	DF Buffer	TRFO, 10 minutes
-	-	SPFO

- Process Use: The following was performed on the resulting initial anion-exchange pool (Q-pool) obtained from a preceding separation step, for example, a
20 Q-Sepharose chromatography step:

a first ultrafiltering or first ultrafiltration (UF1) to a concentration from about 5 g/L to a concentration for diafiltration (C_{DF});

- diafiltering or diafiltration (DF1) with four (4) diafiltration volumes (DV)
25 with the DF buffer;

continued diafiltering (DF2) with four (4) diafiltration volumes (DV) of DF buffer;

a second ultrafiltering or second ultrafiltration (UF2) to a final concentration (C_{Final}); and

- 30 optional product recovery.

The foregoing steps were typically accomplished at low dP Recycle (mix), for example, 15 min.

Post-Use Cleanout: The following tabulated sequence and conditions were used for cleanout on the Pellicon-2 cassette membranes immediately following use.

Volume (L/ft ²)	Solution (room temp)	Mode
1.0	0.1N NaOH	SPFO
0.5	0.1N NaOH	TRFO, 30 minutes
-	-	SPFO
1.0	WFI	SPFO
0.5	300 ppm Minncare [®]	TRFO, 30 minutes
-	-	SPFO
1.0	WFI	SPFO
-	-	Integrity Test @ 30 psig
0.5	0.1N NaOH	TRFO, 15 minutes storage

Definitions for Modes of Operation in TFF.

Single Pass with Filtrate Open (SPFO). The retentate and filtrate are directed to drain. Filtrate valve open.

Total Recycle with Filtrate Open (TRFO). The retentate and filtrate are directed to recycle vessel. Filtrate valve open.

Fed-Batch Ultrafiltration (FB-UF). The retentate is directed to the recycle tank, the filtrate directed to drain, and the incoming pool transferred into the recycle tank.

Batch Ultrafiltration (B-UF). The retentate is directed to the recycle tank and the filtrate is directed to drain.

Diafiltration (DF). The retentate is directed to the recycle tank, the filtrate is directed to drain, and the diafiltration buffer is transferred into recycle tank.

dP refers to differential pressure.

Product Transfer. The ultrafilter membrane unit and recycle tank are open to the pool tank. The nitrogen overlay pressure is controlled. The pool is transferred first using the recycle pump and then using a manual peristaltic pump.

Feed Transfer. The incoming pool is pumped into the recycle tank.

Total Recycle with Filtrate Closed (TRFC). The retentate is directed to a recycle vessel. Filtrate valve closed.

"Q-pool" refers to the protein pool resulting from, for example, a preceding
5 Q-Sepharose chromatography step which has been conditioned with buffer, also referred to as the "conditioned pool."

WFI refers to water-for-injection.

EXAMPLES

10 The following examples serve to more fully describe the manner of using the above-described disclosure, as well as to set forth the best modes contemplated for carrying out various aspects of the disclosure. It is understood that these examples in no way serve to limit the true scope of this disclosure, but rather are presented for illustrative purposes.

15 Example 1

High Concentration Formulation of rhuMAb E25 A pilot scale UF system was used to concentrate/formulate rhuMAb E25 (a recombinant human monoclonal antibody that targets IgE, U.S.P. 6,172,213). A Millipore Pelicon Ultrafiltration /
Diafiltration system was assembled with a 5.7-sqft, 10,000-dalton regenerated
20 cellulose composite membrane. The system consisted of a membrane holder, a Waukeskaw Model 6 rotary lobe feed pump, ½" 316L stainless steel recirculation piping, and a recirculation vessel. Pressure indicators / transmitters (Anderson) were located at the inlet (FEED), outlet (RETENTATE) and permeate (FILTRATE) of the membrane holder. Flow meters (Yokogawa ADMAG) were located at the inlet
25 (FEED) and permeate (FILTRATE) of the membrane holder. A back-pressure regulating valve (Mikroscal) was located at the outlet of the membrane holder to control the retentate pressure and effect the transmembrane pressure (TMP). A 40-liter 316L stainless steel jacketed tank was used for the recirculation vessel. This tank was fitted with a level indicator, top-mounted agitator (Lightnin), vortex
30 breaker and bottom valve (NovAseptic). Temperature control was achieved through the use of temperature modulated glycol fed to the jacket of the tank.

During this run, the feed flow rate was set to a constant rate of 2.85 L/min (0.5L/min/ft²). During all pre-use and post-use operations the retentate pressure control was set to a constant of 10 psig. During the ultrafiltering and diafiltering

operations the system used a C_{wall} control scheme to control the flux through the membrane, see for example R. van Reis, et al., Constant C_{wall} Ultrafiltration Process Control, *J. of Membrane Science*, 130 (1997), 123-140.

5 Prior to the process, the system storage solution (0.1N NaOH) was flushed in a single pass to drain mode, first with 2L/ft² purified water (PW) and then 1L/ft² diafiltration buffer (50 mM Histidine / pH 6.0). After the flushes, the system was equilibrated by recirculating 0.5L/ft² diafiltration buffer for 10 min. The pH of the recirculated solution was checked to confirm the equilibration. The level in the tank
10 was then reduced to a minimum measurable value to minimize dilution of the incoming protein pool. The protein pool resulting from a preceding Q-Sepharose chromatography step was measured to be 3.2 g E25/L and had a volume of 43.1 L. The protein was in a solution of 25 mM TRIS buffer and about 200 mM NaCl and pH adjusted to 6.2. To begin the run the protein pool was transferred to the
15 recirculation vessel. In the vessel the pool was agitated via the top mounted impeller and the temperature was maintained at ambient (20-25°C).

During the process the pool was concentrated in UF1 mode to 50 g E25/L (about 2.8L). At the beginning of diafiltration the temperature set point of the recirculation vessel was increased to 40°C. The increase in temperature and control
20 was affected by flowing warm glycol through the outer jacket of the tank. The pool was then diafiltered with 8 diavolumes of diafiltration buffer. The diafiltration was performed at a constant volume, which was achieved by matching the flow rate of buffered solution being transferred into the recirculation tank to the flow rate of filtrate being removed from the system. At the end of the diafiltration, the pool was
25 further concentrated in UF2 mode. This phase was also performed using an elevated temperature set point of 40°C. The target for this final concentration was 110 g/L. This was achieved without the need to reduce the feed flow rate. Next, a low pressure drop mixing was performed where the feed pump was controlled to maintain a 5-10 psig pressure drop across the feed channel. A sample was pulled
30 from the recirculation tank and a final bulk concentration of approximately 120 g/L was measured. Table 1 summarizes the throughput and flux results of UF1, DF (DF1+DF2), and UF2.

35

Table 1.

Process Phase	Normalized Throughput (g/ft ² /hr)	Normalized Flux (LMH/psig)
UF1	13.8	4.97
DF	13.8	2.92
UF2	181.4	1.64

FIG. 2 shows the observed or measured process values over time for the feed flow rate (210), tank temperature (220), feed dP (230), TMP (240), and filtrate flow rate (250) parameters during the various phases or mode of the process including UF1 (10), DF (20), UF2 (30).

FIG. 3 shows the observed or measured process values over time for the E25 concentration (310), flux (320), and TMP (240).

FIG. 4 shows the observed or measured process values over time for pressure drop versus protein concentration observed for UF1 (410) and UF2 (420) at 37 °C.

The protein pool was recovered by a series of steps. First the pool in the recirculation tank was pumped from the tank through a Millipac 200, 0.22 microns sterilizing grade filter using the rotary lobe feed pump. Next the protein solution was displaced from the piping and membrane unit with a 5 psig nitrogen gas blow down applied to the highest point on the retentate line. The final phase was a blow down of the tank and feed line, also using the 5 psig nitrogen gas.

The product recovery was believed to be improved compared to Example 1 when conducted at ambient temperature because the elevated temperature used in one or more of the ultrafiltering, diafiltering, or recovery steps reduced viscous effects. For example, when the temperature control was turned off during product recovery, the system slowly cooled during this operation causing difficulties for recovery from the membrane unit. Alternatively, the recovery can be performed first from the membrane holder and then from the recirculation vessel.

To determine the mass of loss during recovery, 1.74 L of DF buffer was added to the system and recirculated for about 5 minutes and recovered using the same sequence as described above. This volume was then analyzed for protein concentration with the other pools. Table 2 summarizes the results.

Table 2.

	Volume (L)	Concentration (g/L)	Mass (g)	Yield or {Loss} (%)
Q-Pool	43.1	3.2	137.9	100
Recovered Pool	0.99	120	118.8	86.1
Buffer Flush	1.74	9.8	17.1	12.4
Filtrate	65.3	0.04	2.6	1.9

Post processing, the membrane was regenerated using 0.1N NaOH, 1L/ft² single pass flush followed by 0.5L/ft² total recirculation for 30 min. This was followed by 1L/ft² PW (pure water) flush. This was followed by a total recirculation of 300 ppm Minncare[®] solution for 30 min. The system was again flushed with 1L/ft² PW and finally recirculated for 15 min with 0.1N NaOH and stored. The recovered pool was diluted to 80 g E25/L and conditioned into the final formulation of 50 mM histidine / 150 mM trehalose / 0.02% polysorbate 20 / pH 6.0. Product quality was assessed by size exclusion chromatography (SEC) for both the incoming Q-Pool and final recovered bulk. This data is summarized in Table 3.

Table 3.

Pool	SEC Results (% monomer)
Q-Pool	99.8
Final Bulk	99.8

15

Comparative Example 2

High Concentration Formulation of rhuMAb E25 at Ambient Temperature
Example 1 was accomplished with the following exceptions. Prior to the process, the system storage solution (0.1N NaOH) was flushed in a single pass to drain mode first with 2L/ft² purified water (PW) and then 1L/ft² diafiltration buffer (20 mM histidine / pH 6.0). After the flushes the system was equilibrated by recirculating 0.5L/ft² diafiltration buffer for 10 min. The pH of the recirculated solution was checked to confirm the equilibration. The level in the tank was then reduced to a minimum measurable value to minimize dilution of the incoming protein pool.

The protein pool resulting from the preceding Q-Sepharose chromatography step was measured to be 3.3 g E25/L and had a volume of 33.3 L. The protein was in a solution of 25 mM TRIS buffer and about 200 mM NaCl and pH adjusted to

6.2. To begin the run the protein pool was transferred to the recirculation vessel. In the vessel the pool was agitated via the top mounted impeller and the temperature was maintained at ambient (20-25°C). During the process the pool was concentrated down in UF1 mode to 50 g E25/L (about 2.2 L). The pool was then diafiltered with 8 diavolumes of diafiltration buffer. The diafiltration was performed at a constant volume, which volume was achieved by matching the flow rate of buffered being transferred into the recirculation tank to the flow rate of filtrate being removed from the system. The diafiltration was also performed at ambient temperature. At the end of the diafiltration, the pool was further concentrated in UF2 mode. The target for this final concentration was 110 g/L. However, due to a high pressure drop across the feed channel, this concentration was not achieved. In an attempt to achieve this concentration the feed flow rate was reduced to 1.4 L/min at a bulk concentration of about 80 g E25/L because the pressure drop across the feed channel had reached 50 psig. UF2 was continued until a high pressure drop of 50 psig again was reached and the process was stopped. Next, a low pressure drop mixing was attempted where the feed pump was used to maintain a 5 psig pressure drop across the feed channel. Again, the viscous nature of the protein solution made it difficult to achieve since the rotary lobe pump reached excess pressures. A sample was pulled from the recirculation tank and a final bulk concentration of approximately 104 g/L was measured. Table 4 summarizes throughput and flux measured during the UF1, DF (DF1+DF2), and UF2 phases.

Table 4.

Process Phase	Normalized Throughput (g/ft ² /hr)	Normalized Flux (LMH/psig)
UF1	14.5	5.31
DF	9.5	1.47
UF2	144.6	0.78

FIG. 5 shows the observed or measured process values over time for the feed flow rate (210), tank temperature (220), fed dP (230), TMP (240), and filtrate flow rate (250) parameters during the various phases or mode of the process including UF1 (10), DF (20), UF2 (30).

FIG. 6 shows the observed or measured process values over time for the E25 concentration (310), flux (320), and TMP (240).

FIG. 7 shows the observed or measured process values over time for pressure drop versus protein concentration observed for UF1 (410) and UF2 (420) at 24 °C.

The protein pool was recovered in steps. First, the pool in the recirculation tank was pumped from the tank through a Millipac 200, 0.22 microns sterilizing grade filter using the rotary lobe feed pump. Next the protein solution was displaced from the piping and membrane unit with a 5 psig nitrogen gas blow down applied to the highest point on the retentate line. The product recovery from this was very poor due to the viscous nature of the solution. The final phase was a blow down of the tank and feed line, also using the 5 psig nitrogen gas.

To determine the mass of loss during recovery, 1.85 L of DF buffer was added to the system and recirculated for about 5 minutes and recovered using the sequence of Example 1. This volume was then analyzed for protein concentration with the other pools. Table 5 summarizes the results.

Table 5.

	Volume (L)	Concentration (g/L)	Mass (g)	Yield or {Loss} (%)
Q-Pool	33.3	3.3	109.9	100
Recovered Pool	0.77	104.4	80.4	73.1
Buffer Flush	1.85	14.7	27.2	24.7
Filtrate	52.2	0.03	1.6	1.5

Post process, the membrane was regenerated using 0.1N NaOH, 1L/ft² single pass flush followed by 0.5L/ft² total recirculation for 30 min. This was followed by 1L/ft² PW flush. This was followed by a total recirculation of 300 ppm Minncare[®] solution for 30 min. The system was again flushed with 1L/ft² PW and finally recirculated for 15 min with 0.1N NaOH and stored. The recovered pool was diluted to 80 g E25/L and conditioned into the final formulation of 20 mM histidine / 250 mM sucrose / 0.02% polysorbate 20 / pH 6.0. Product quality was assessed by size exclusion chromatography (SEC) for both the incoming Q-Pool and final recovered bulk. This data is summarized in Table 6.

Table 6.

Pool	SEC Results (% monomer)
Q-Pool	99.8
Final Bulk	99.8

Example 3

5 **High Concentration Formulation of rhuMAb E26 with Initial Fed-Batch Mode**
Example 1 was repeated with the following exceptions. The concentrate/formula was rhuMAb E26 (a recombinant human monoclonal antibody that targets IgE).

The products from this example were used in toxicology assessment. The Millipore Pelicon Ultrafiltration/Diafiltration system was assembled with a 11.4-sqft 30,000-
10 Dalton regenerated cellulose composite membrane. The feed flow rate was set to a constant rate of 5.0L/min (0.44L/min/ft²). During the ultrafiltration and diafiltration operations the retentate pressure was maintained between about 6-8 psig. The protein pool resulting from the preceding Q-Sepharose chromatography step was measured to be 6.7 g E26/L and had a volume of 59.3 L.

15 Because the incoming pool was larger than the recirculation vessel, the UF1 process began in fed-batch mode. In this mode, Q-Pool was added to the recirculation vessel at approximately the same rate as filtrate passes through the TFF membrane to drain. After the remaining Q-Pool had transferred to the recirculation vessel, the UF1 process continued in batch mode. During the UF1 the pool was
20 concentrated to 50 g E26/L (about 7.9 L). At the beginning of diafiltration the temperature set point of the recirculation vessel was increased to 40°C. The increase in temperature and control was affected by flowing warm glycol through the outer jacket of the tank. The pool was then diafiltered with 8 diavolumes of diafiltration buffer. The diafiltration was performed at a constant volume which was achieved by
25 matching the flow rate of buffered being transferred into the recirculation tank to the flow rate of filtrate being removed from the system. At the end of the diafiltration, the pool was further concentrated in UF2 mode to a final concentration of 109 g E26/L (3.6L). This phase was also performed using an elevated temperature set point of 40°C. Next a low pressure drop mixing was performed where the feed
30 pump was controlled to maintain a 5-10 psig pressure drop across the feed channel.

Table 7 summarizes the throughput and flux results of UF1, DF (DF1+DF2), and UF2.

5

Table 7.

Process Phase	Normalized throughput (g/ft ² /hr)	Normalized Flux (LMH/psig)
UF1	26.1	3.71
DF	19.2	2.34
UF2	174.2	1.80

FIG. 8 shows the observed or measured process values over time for the feed flow rate (210), tank temperature (220), fed dP (230), TMP (240), and filtrate flow rate (250).

10

FIG. 9 shows the observed or measured process values over time for the E26 concentration (910), flux (920), and TMP (940).

FIG. 10 shows the observed or measured process values over time for pressure drop versus protein concentration observed for UF1 (1010) and UF2 (1020).

15

Just prior to product recovery, a 10 mL sample was analyzed for detection and a titer of bioburden. A typical reject limit is 1,000 Colony Forming Units (CFU) per mL. The results of this test were 1.8 CFU/mL, a suitable value at this step and well below the reject limit. To determine the mass of loss during recovery, 908.1 mL of DF buffer was added to the system and recirculated for about 5 minutes and recovered using the same sequence described above. This volume was then analyzed for protein concentration with the other pools. Table 8 summarizes the results.

20

Table 8.

	Volume (L)	Concentration (g/L)	Mass (g)	Yield or {Loss} (%)
Q-Pool	59.3	6.7	397.3	100
Recovered Pool	3.41	109.1	372.0	93.6
Buffer Flush	0.908	20.4	18.5	4.7
Filtrate	120	n/d	n/d	n/d

25

37 38

The recovered pool was diluted to 80 g E26/L and conditioned into the final formulation of 50 mM histidine / 150 mM trehalose / 0.02% polysorbate 20 /pH 6.0. Product quality was assessed by size exclusion chromatography (SEC) for the incoming Q-Pool, the retentate pool after UF1, the retentate pool after DF, and final recovered bulk. This data is summarized in Table 9.

Table 9.

Pool	SEC Results (% monomer)
Q-Pool	99.8
End of UF1	99.8
End of DF	99.8
Final Bulk	99.8

10

Example 4

High Concentration Formulation of rhmAb E26 for Toxicology Evaluation—Comparison of 10kD and 30kD Example 3 was repeated with the following exceptions. Two pilot scale UF systems were used to concentrate/formulate rhmAb E26. Two Millipore Pelicon Ultrafiltration / Diafiltration systems were assembled with a 11.4-sqft, regenerated cellulose composite membrane, one with 10,000-Dalton pore size and the other a 30,000-Dalton pore size. The retentate pressures were maintained at about 6-9 psig.

10 kD Process

20

The protein pool resulting from the preceding Q-Sepharose chromatography step was measured to be 5.85 g E26/L and had a volume of 62.4 L. During the UF1, the pool was concentrated to 50 g E26/L (about 7.3 L). At the end of the diafiltration, the pool was further concentrated in UF2 mode to a final concentration of 107.5 g E26/L (3.4L). Table 10 summarizes the throughput and flux results of UF1, DF, and UF2.

25

Table 10.

Process Phase	Normalized throughput (g/ft ² /hr)	Normalized Flux (LMH/psig)
UF1	21.8	3.6
DF	15.9	2.6
UF2	137.4	1.93

To determine the mass of loss during recovery, 987 mL of DF buffer was added to the system and recirculated for about 5 minutes and recovered using the same sequence described above. This volume was then analyzed for protein concentration with the other pools. Table 11 summarizes the results.

Table 11.

	Volume (L)	Concentration (g/L)	Mass (g)	Yield or {Loss} (%)
Q-Pool	62.4	5.85	365.4	100
Recovered Pool	3.38	107.5	361.7	98.9
Buffer Flush	0.987	19.9	19.6	5.4
Filtrate	125	n/d	n/d	n/d

10

FIG. 11 shows the observed or measured process values over time for the feed flow rate (210), tank temperature (220), fed dP (230), TMP (240), and filtrate flow rate (250) over the various phases or mode of the process including UF1 (10), DF (20), UF2 (30), and low dP (40), for the 10 kD process.

FIG. 12 shows the observed or measured process values over time for the E26 concentration (1210), flux (1220), and TMP (1240) over the various phases or mode of the process including UF1 (10), DF (20), UF2 (30), and low dP (40), for the 10 kD process.

FIG. 13 shows the observed or measured process values over time for pressure drop versus protein concentration observed for UF1 (1310) and UF2 (1320) for the 10 kD process.

30 kD Process

The protein pool resulting from the preceding Q-Sepharose chromatography step was measured to be 5.85 g E26/L and had a volume of 64.5 L. During the UF1 the initial pool was concentrated to 50 g E26/L (about 7.5L). At the end of the

40

diafiltration, the pool was further concentrated in UF2 mode to a final concentration of 117.5 g E26/L (3.2 L). Table 12 summarizes the throughput and flux results of UF1, DF, and UF2.

5

Table 12.

Process Phase	Normalized throughput (g/ft ² /hr)	Normalized Flux (LMH/psig)
UF1	25.5	4.01
DF	17.6	2.39
UF2	180.5	1.57

To determine the mass of loss during recovery, 918 mL of DF buffer was added to the system and recirculated for about 5 minutes and recovered using the same sequence described above. The recovered pool was diluted to 80 g E26/L and conditioned into the final formulation of 50 mM histidine / 150 mM trehalose / 0.02% polysorbate 20 /pH 6.0. Table 13 summarizes the results.

10

Table 13.

	Volume (L)	Concentration (g/L)	Mass (g)	Yield or {Loss} (%)
Q-Pool	64.5	5.85	377.3	100
Recovered Pool	3.20	117.5	376.0	99.6
Buffer Flush	0.918	22.7	20.8	5.5
Filtrate	125	n/d	n/d	n/d

15

FIG. 14 shows the observed or measured process values over time for the feed flow rate (210), tank temperature (220), fed dP (230), TMP (240), and filtrate flow rate (250) over the various phases or mode of the process including UF1 (10), DF (20), UF2 (30), and low dP (40), for the 30 kD process.

20

FIG. 15 shows the observed or measured process values over time for the E26 concentration (1510), flux (1520), and TMP (1540) over the various phases or mode of the process including UF1 (10), DF (20), UF2 (30), and low dP (40), for the 30 kD process.

FIG. 16 shows the observed or measured process values over time for pressure drop versus protein concentration observed for UF1 (1610) and UF2 (1620) for the 30 kD process.

5

Example 5

Liquid rhuMAb E25 Scale Up Example 1 was repeated with the following exceptions.

- 10 A production scale UF system was used to concentrate/formulate a liquid rhuMAb E25 (a recombinant human monoclonal antibody that targets IgE). The product can be used in therapeutic application and human bio-equivalency trials. The Millipore Pelicon Ultrafiltration / Diafiltration systems were assembled with a 226-sqft regenerated cellulose composite membrane, with a pore size of 30,000-Dalton. Each system consisted of a membrane holder, a Viking S3S rotary lobe feed pump, 1½"
- 15 316L stainless steel recirculation piping, and a 250-L recirculation vessel.

- One 250-liter 316L stainless steel jacketed tank was used for the recirculation vessel. Temperature control to this tank was achieved with a temperature modulated glycol fed to the tank's jacket. The temperature of the glycol fed to the tank jacket was raised or lowered using either steam-fed heat exchanger or
- 20 cold glycol supply respectively.

- For this run, the feed flow rate was set to a constant rate of 114 L/min (0.5L/min/ft²). The diafiltration buffer (20 mM histidine /200 mM arginine chloride/ pH 6.0) was prepared in a separate tank. The temperature of this buffer was set to 45 °C prior to the process. This enabled accurate temperature control throughout the
- 25 process.

- Prior to processing, the system storage solution (0.1N NaOH) was flushed in a single pass to drain mode first with 1L/ft² water for injection (WFI) and then 1L/ft² diafiltration buffer. After the flushes, the system was equilibrated by recirculating 0.5L/ft² diafiltration buffer for 10 min. The pH of the recirculated solution was
- 30 checked to confirm the equilibration.

- The protein pool resulting from the preceding Q-Sepharose chromatography step was measured to be 5.2562 g E25/L and had a volume of 1,141 L. The protein was in a solution of 25 mM TRIS buffer and about 200 mM NaCl and the pH was adjusted to 6.2. Just prior to the run, the temperature set point of this pool was set to
- 35 45 °C. To begin the run the protein pool was transferred to the recirculation vessel,

through a 0.22 microns sterilizing grade filter to a level of about 200 L in the tank. In the vessel the pool was agitated via a top mounted impeller and the temperature was maintained at about (40-50 °C). Because the incoming pool was larger than the recirculation vessel, the UF1 process began in fed-batch mode. In this mode, Q-Pool was added to the recirculation vessel at approximately the same rate as filtrate passes through the TFF membrane to drain. After the remaining Q-Pool was transferred to the recirculation vessel, the UF2 process was continued in batch mode. During the UF1 mode the pool was concentrated to about 30 g E25/L (about 200 L). The pool was then diafiltered with about 8 diavolumes of diafiltration buffer. During diafiltration the temperature was maintained between 40° and 50°C. The diafiltration was performed at a constant volume, which was achieved by matching the flow rate of buffer being transferred into the recirculation tank to the flow rate of filtrate being removed from the system. At the end of the diafiltration, the pool was further concentrated in UF2 mode to a final concentration set point of >170 g E25/L (35 L). This UF2 mode phase was also performed at an elevated temperature set point of 45°C+/-5°C. Next, a low pressure drop mixing was performed where the feed pump was controlled to maintain a 5-10 psig pressure drop across the feed channel. A sample was pulled and a spec scan was performed to confirm the concentration prior to recovery. The concentration of this sample was 219 g E25/L. Table 14 summarizes throughput and flux measured during the UF1, DF (DF1+DF2), and UF2 phases.

Table 14.

Process Phase	Normalized throughput (g/ft ² /hr)	Normalized Flux (LMH/psig)
UF1	43.8	3.34
DF	25.9	2.46
UF2	78.9	0.66

Just prior to product recovery, a 30 mL sample was pulled and submitted for detection and titer of bioburden. The result was <0.13 CFU/mL. The protein pool was recovered by a series of steps. First, the product was displaced from the membrane in a single pass mode using 5 L of DF buffer added to the retentate line. The product was filtered into a recovery tank through a 7.4 ft², 0.22 microns sterilizing-grade guard filter followed by a 2 ft², 0.22 microns sterilizing-grade final

filter. The pool in the recirculation tank was then pumped from the tank using the rotary lobe feed pump. Next the residual protein solution was displaced from tank and feed line with a 5 psig nitrogen gas blow down. The final phase was a blow
5 down of the membrane unit, which now contained mostly DF buffer from the initial product displacement. This phase also used the 5 psig nitrogen gas applied to the highest point on the retentate line. The recovered pool was diluted first to about 153 g E25/L using DF buffer. Finally, the pool was conditioned into the final
10 formulation of 20 mM histidine / 200 mM arginine-HCl / 0.04% polysorbate 20 / pH 6.0. The volumes of the recovered pool, diluted pool, and conditioned pool (Q-pool) were then each analyzed for protein concentration. Table 15 summarizes the results.

Table 15.

	Volume (L)	Concentration (g/L)	Mass (g)	Yield or {Loss} (%)
Q-Pool	1,141	5.2562	5,997.3	100
Recovered Pool	35.0	170.0	5,950.0	99.2
Diluted Pool	39.0	147.0	5,726	95.5

15 FIG. 17 shows feed flow rate (210), tank temperature (220), fed dP (230), TMP (240), and filtrate flow rate (250) parameters during the various phases or mode of the process including UF1 (10), DF1 (20), DF2 (25), UF2 (30), and low dP (50).

20 Example 6

Liquid rhuMAb E25 Preparation Example 5 was repeated with following exceptions. A production scale UF system was used to concentrate/formulate liquid rhuMAb E25 (E25, a recombinant human monoclonal antibody that targets IgE). The Millipore Pelicon Ultrafiltration / Diafiltration systems were assembled with a
25 226-sqft regenerated cellulose composite membrane, with a pore size of 30,000-dalton. Each system consisted of a membrane holder, a Viking S3S rotary lobe feed pump, 1½" 316L stainless steel recirculation piping, and a 250-L recirculation vessel. One 250-liter 316L stainless steel jacketed tank was used for the recirculation vessel. The feed flow rate was set to a constant rate of 114 L/min (0.5
30 L/min/ft²). During all pre-use and post-use operations the retentate pressure control

was set to a constant of 10 psig. During the ultrafiltration and diafiltration operations the system used the C_{mem} control scheme to control the flux through the membrane. The diafiltration buffer (20 mM Histidine /200 mM arginine chloride/ pH 6.0) was prepared in a separate tank. The temperature of this buffer was set to 45 °C prior to the process. This enabled accurate temperature control through the entire process. The protein pool resulting from the preceding Q-Sepharose chromatography step was measured to be 5.5438 g E25/L and had a volume of 1,082 L. The protein was in a solution of 25 mM TRIS buffer and about 200 mM NaCl and pH adjusted to 6.2. Just prior to the run, the temperature set-point of this pool was set to 45°C. To begin the run the protein pool was transferred to the recirculation vessel, through a 0.22 microns sterilizing grade filter to a level of about 200 L in the tank. In the vessel the pool was agitated via the top mounted impeller and the temperature was maintained at ambient (40-50°C). Because the incoming pool was larger than the recirculation vessel, the UF1 process began in fed-batch mode. In this mode, Q-Pool was added to the recirculation vessel at approximately the same rate as filtrate passes through the TFF membrane to drain. After the remaining Q-Pool had transferred to the recirculation vessel, the UF1 process continued in batch mode. During the UF1 the pool was concentrated to about 30 g E25/L (about 200 L). The pool was then diafiltered with 8 diavolumes of diafiltration buffer. During diafiltration the temperature was maintained between 40 and 50 °C. The diafiltration was performed at a constant volume, which was achieved by matching the flow rate of buffered being transferred into the recirculation tank to the flow rate of filtrate being removed from the system. At the end of the diafiltration, the pool was further concentrated in UF2 mode to a final concentration set-point of greater than 170 g E25/L (35 L). This phase was also performed at an elevated temperature set point of 45 °C $\pm$ 5 °C. Next, a low pressure drop mixing was performed where the feed pump was controlled to maintain a 5-10 psig pressure drop across the feed channel. A sample was pulled and a spec scan was performed to confirm the concentration prior to recovery. The concentration of this sample was 191 g E25/L and the pool volume was 31.9 L. A graph of the process parameters over time were comparable to those observed and summarized for the above FIG. . 17.

45

Table 14.

Process Phase	Normalized throughput (g/ft ² /hr)	Normalized Flux (LMH/psig)
UF1	45.1	3.21
DF	25.9	2.51
UF2	121.4	0.79

Just prior to product recovery, a 30 mL sample was pulled and analyzed for a titer of bioburden. The results of this test were below the detection limit (< 0.13 CFU/mL).

The protein pool was recovered by a series of steps. First the product was displaced from the membrane in a single pass mode using 5 L of DF buffer added to the retentate line. The product was filtered into a recovery tank through a 7.4 ft², 0.22 microns sterilizing-grade guard filter followed by a 2 ft², 0.22 microns sterilizing-grade final filter. The pool in the recirculation tank was then pumped from the tank using the rotary lobe feed pump. Next, the residual protein solution was displaced from tank and feed line with a 5 psig nitrogen gas blow down. The final phase was a blow down of the membrane unit, which contained mostly DF buffer from the initial product displacement. This phase also used 5 psig nitrogen gas applied to the highest point on the retentate line. The recovered pool was diluted first to about 153 g E25/L using DF buffer. Finally the pool was conditioned into the final formulation of 20 mM histidine / 200 mM arginine-HCl / 0.04% polysorbate 20 /pH 6.0. The volumes of the recovered pool, diluted pool, and conditioned pool were then analyzed for protein concentration. Table 15 summarizes the results. Post process, the membrane was regenerated as described above.

Table 15.

	Volume (L)	Concentration (g/L)	Mass (g)	Yield or {Loss} (%)
Q-Pool	1,082	5.5438	5,998.4	100
Recovered Pool	34.95	167.08	5,839.8	97.4
Diluted Pool	38.2	152.14	5,810.3	96.7

Example 7

Effect of Elevated Temperature on Product Quality E25 samples at 30 g/L and 150 g/L in histidine and Q buffers were kept at various temperatures for 24 hours.

- 5 Samples were taken for turbidity measurements and SEC assays. The results of turbidity versus temperature for E25 at 30 g/L in Q buffer are shown in FIG. 18. FIG. 19 shows the amount of soluble aggregate of E25 (150 g/L in 50mM histidine buffer, pH 6.0) observed over time and at temperatures of 23°C, 40°C, 50°C, 60°C and 70°C. The four time intervals (time of 0 hours, 4 hours, 7.5 hours, and 24
- 10 hours) for each of these temperatures is shown as the cluster of four bars from left to right as 1810 and 1910, in FIGS. 18 and 19. The solution turbidity was essentially unchanged after 24 hours at 60°C. No significant soluble aggregate of E25 was observed below 70°C suggesting the product samples were substantially stable up to at least 60°C and at least 24 hours.

15

Example 8

Effect of Elevated Temperature on Bioburden E25 samples at 30 g/L in both arginine and histidine buffers were inoculated with 10^3 colony forming units per mL for two challenge organisms: a Gram positive strain (*Staphylococcus aureus*); and

20 one Gram negative strain (*Pseudomonas chlororaphis*). Samples were taken after 1.5 hours and 6 hours. The results shown in the bar charts of FIGS. 20 and 21 indicate that these challenge organisms both decreased with increasing temperature. The three temperature intervals (temp of 25°C, 40°C, and 50°C hours) for each observed time interval is shown as the cluster of three bars from left to right as 2010 and 2110, in FIGS. 20 and 21. The inoculations shown were conducted in arginine

25 buffer with protein concentrations of 30 g/L.

Example 9

- Effect of Elevated Temperature on Process Flux** E25 samples at 10 g/L in 0.2M arginine, 25 mM histidine, pH 6.0 buffer were evaluated for their influence on flux
- 30 versus transmembrane pressure (TMP). FIG. 22 shows that raising the system temperature also increased the process flux during the UF/DF operations. Flux excursions at various bulk concentrations and three different temperatures of 23 °C (2210), 40 °C (2220), and 46 °C (2230) were performed. The mass transfer

coefficient and filtrate flux increased by about 2 to about 3 fold providing considerably reduced process times.

5

Example 10

High Concentration Formulation of rhuMAB anti-CD20 ("2H7") A pilot scale UF system was used to concentrate and formulate rhuMAB anti-CD20 (2H7; a recombinant human monoclonal antibody). Example 1 was repeated with the following exceptions. The Millipore Pelicon Ultrafiltration / Diafiltration systems were assembled with a 17.5-sqft, regenerated cellulose composite membrane, with a pore size of 30,000-Dalton. The system consisted of a membrane holder, a Viking S1 L rotary lobe feed pump, 1/2" 316 L stainless steel recirculation piping, and a 40-L recirculation vessel. Backpressure regulating valves were H.D. Baumann, Inc. The temperature of the glycol fed the tank jacket was regulated higher or lower as needed using an electric heat exchanger, a cold glycol supply, or both.

During this run, the feed flow rate was set to a constant rate of 8.5 L/min (approximately 0.5L/min/ft²). FIG. 23 displays the value trends over time for feed flow rate (210) scaled from 0 to 20, pH (212) scaled from 2 to 12, filtrate flow rate (250) scaled from 0 to 5, recycle tank level (2320) scaled from 0 to 45, and retentate dP (2350) scaled from 0 to 100 during the various phases or mode of the process including UF1 (10), DF1 (20), and UF2 (30).

During the ultrafiltration and diafiltration operations the system used constant retentate pressure followed by a constant feed/retentate delta pressure control scheme to control the flux through the membrane. The diafiltration buffer (30 mM sodium acetate / pH 4.9) was prepared in a separate tank. The temperature of this buffer was set to 45°C prior to the process for accurate temperature control through the entire process. Prior to processing, the system storage solution (0.1 N NaOH) was flushed in a single pass to drain mode first with 1 L/ft² water for injection (WFI) and then 1 L/ft² diafiltration buffer. After the flushes the system was equilibrated by recirculating 0.5 L/ft² diafiltration buffer for 10 min. The pH of the recirculated solution was checked to confirm the equilibration.

The protein pool resulting from a preceding Q-Sepharose chromatography step was measured to be 2.31 g 2H7/L and had a volume of 356 L. The protein was in a solution of 6 mM HEPES free acid / 19 mM HEPES sodium salt and 25 mM sodium acetate that had been pH adjusted to 5.3 with 0.5 M acetic acid. Just prior to

the run, the temperature set point of this pool was set to 45°C. To begin the run the protein pool was transferred to the recirculation vessel through a 0.22 microns sterilizing grade filter to a level of about 40 L in the tank. In the vessel the pool was agitated via the top mounted impeller and the temperature was maintained at 40-50°C.

Because the incoming pool was larger than the recirculation vessel, the UF1 process began in fed-batch mode (see FIG. 23). In this mode, Q-Pool was added to the recirculation vessel at approximately the same rate as filtrate passes through the TFF membrane to drain. After the remaining Q-Pool has transferred to the recirculation vessel, the UF1 process continued in batch mode. During the UF1 the pool was concentrated to about 50 g 2H7/L (about 16 L). The pool was then diafiltered with 10 diavolumes of diafiltration buffer. During diafiltration the temperature was maintained between 40 and 50°C. The diafiltration was performed at a constant volume, which was achieved by matching the flow rate of buffered being transferred into the recirculation tank to the flow rate of filtrate being removed from the system. At the end of the diafiltration, the pool was further concentrated in UF2 mode to a final concentration target set point of 190 g 2H7/L (4.3 L). See in FIG. 23 the incorporation of constant dP control at 50 psig at the end of this phase. This phase was also performed at an elevated temperature set point of 45°C $\pm$ 5°C. Next, a low pressure drop mixing was performed where the feed pump was controlled to maintain a 20 psig pressure drop across the feed channel. A sample was pulled and a density measurement was performed to confirm the concentration prior to recovery. The concentration of this sample was 189 g 2H7/L. Table 16 summarizes the throughput and flux results.

Table 16.

Process Phase	Normalized throughput (g/ft ² /hr)	Normalized Flux (LMH/psig)
UF1	32	4.8
DF	56	2.4
UF2	267	1.6

The protein pool was recovered by a series of steps. First the product is displaced from the membrane in a single pass mode using 0.2 L of DF buffer added to the retentate line. The product is filtered into a recovery tank through a 0.22
5 microns sterilizing-grade final filter. The pool in the recirculation tank was then pumped from the tank using the rotary lobe feed pump. Next, the residual protein solution is displaced from tank and feed line with a 5 psig nitrogen gas blow down. The final phase was a blow down of membrane unit, which now contains DF buffer from the initial product displacement. This phase also used the 5 psig nitrogen gas
10 applied to the highest point on the retentate line.

If necessary, the recovered pool was diluted first to about 175 g 2H7/L using dilution buffer (30 mM sodium acetate, pH 5.3). Finally, the pool is diluted down to a target concentration of 150 g 2H7/L and conditioned into the final formulation of 30 mM sodium acetate, 7% trehalose, 0.03% polysorbate 20, pH 5, via a 7 X
15 conditioning buffer (30 mM sodium acetate, 49% trehalose, 0.21% polysorbate 20, pH 5.3).

The volumes of the recovered pool, diluted pool, and conditioned pool were then analyzed for protein concentration. Table 17 presents the results.

20

Table 17.

	Volume (L)	Concentration (g/L)	Mass (g)	Yield or {Loss} (%)
Q-Pool	355.81	2.31	821.92	100.0
Recovered Pool	4.64	180.02	835.3	101.6
Final Pool	4.871	149.40	727.7	88.5

Note: Yields include loss due to sampling. Recovered pool volume and concentration include addition of buffer displacement.

Post process, the membrane was regenerated using 0.1 N NaOH, 1L/ft²
25 single pass flush followed by 0.5 L/ft² total recirculation for 30 min. This was followed by 1 L/ft² PW flush. This was followed by a total recirculation of 0.5 L/ft² 1.4% Minncare solution for 30 min. The system was again flushed with 1 L/ft² PW and finally recirculated for 15 min with 0.1 N NaOH and stored.

30

Example 11

High Concentration Formulation of rhuMAb anti-CD20 A pilot scale UF system was used to concentrate and formulate rhuMAb anti-CD20 (2H7) for use in a human phase I clinical study in a GMP manufacturing facility. Example 10 was repeated with the following exceptions.

The protein pool resulting from a preceding Q-Sepharose chromatography step was measured to be 3.729 g 2H7/L and had a volume of 262 L. The protein was in a solution of 6 mM HEPES free acid / 19 mM HEPES sodium salt and 25 mM sodium acetate that had been pH adjusted to 5.3 with 0.5 M acetic acid. Just prior to the run, the temperature set point of this pool was set to 45°C. To begin the run the protein pool was transferred to the recirculation vessel through a 0.22 microns sterilizing grade filter to a level of about 40 L in the tank. In the vessel the pool was agitated via the top mounted impeller and the temperature was maintained at 40-50°C.

During the UF1 the pool was concentrated to about 50 g 2H7/L (about 20 L). FIG. 24 displays the value trends over time for recycle tank level (210) scaled from -0.713963 to 295.989, retentate dP (2420) scaled from -0.237899 to 98.6629, feed flow rate (250) scaled from -0.356981 to 147.994, and filtrate flow rate (2450) scaled from -0.118994 to 49.3315 during the process. The pool was then diafiltered with 10 diavolumes of diafiltration buffer. During diafiltration the temperature was maintained between 40 and 50°C. The diafiltration was performed at a constant volume, which was achieved by matching the flow rate of buffer being transferred into the recirculation tank to the flow rate of filtrate being removed from the system. At the end of the diafiltration, the pool was further concentrated in UF2 mode to a final concentration target set point of 190 g 2H7/L (5.25 L). Note in FIG. 24 the incorporation of constant dP to 40 psig control at the end of this phase. This phase was also performed at an elevated temperature set point of 45°C +/-5°C. Next, a low pressure drop mixing was performed where the feed pump is controlled to maintain a 20 psig pressure drop across the feed channel. A sample was pulled and a density measurement was performed to confirm the concentration prior to recovery. The concentration of this sample was 194 g 2H7/L. Table 18 summarizes the throughput and flux results.

Table 18.

Process Phase	Normalized throughput (g/ft ² /hr)	Normalized Flux (LMH/psig)
UF1	51	3.8
DF	46	2.2
UF2	286	1.6

Just prior to product recovery, a 30 mL sample was pulled and submitted for detection and titer of bioburden. The results were negative (i.e., <0.13 CFU/mL). The protein pool was recovered by the series of steps of Example 10. The volumes of the recovered pool, diluted pool, and conditioned pool were then analyzed for protein concentration. Table 19 presents the results. The membrane was regenerated as in Example 10.

10

Table 19.

	Volume (L)	Concentration (g/L)	Mass (g)	Yield or {Loss} (%)
Q-Pool	262	3.72	977	100
Recovered Pool	5.0	174.0	863.0	88.3
Diluted Pool	5.421	149.6	811.0	83.0

Example 12

High Concentration Formulation of rhuMAb anti-CD20 GMP Example 11 was repeated with the following exceptions. The protein pool resulting from a preceding Q-Sepharose chromatography step was measured to be 5.106 g 2H7/L and had a volume of 196 L. The protein was in a solution of 6 mM HEPES free acid / 19 mM HEPES sodium salt and 25 mM sodium acetate that had been pH adjusted to 5.3 with 0.5 M acetic acid. Just prior to the run, the temperature setpoint of this pool was set to 45°C. To begin the run the protein pool was transferred to the recirculation vessel through a 0.22 microns sterilizing grade filter to a level of about 40 L in the tank. In the vessel the pool was agitated via the top mounted impeller and the temperature was maintained at 40-50°C.

During the UF1 the pool was concentrated to about 50 g 2H7/L (about 20 L). FIG. 25 displays the value trends over time for recycle tank level (210) scaled from

0 to 300, retentate dP (2520) scaled from 0 to 100, feed flow rate (250) scaled from 0 to 150, and filtrate flow rate (2550) scaled from 0 - 50 during the process. The pool was diafiltered with 10 diavolumes (10 X) of diafiltration buffer. During
5 diafiltration the temperature was maintained between 40 and 50°C. The diafiltration was performed at a constant volume that was achieved by matching the flow rate of buffer being transferred into the recirculation tank to the flow rate of filtrate being removed from the system. At the end of the diafiltration, the pool was further concentrated in UF2 mode to a final concentration target setpoint of 190 g 2H7/L
10 (5.26 L) again utilizing constant dP control at the very end of this phase (see FIG. 25). This phase was also performed at an elevated temperature set point of 45°C+/- 5°C. Next, a low pressure drop mixing was performed where the feed pump is controlled to maintain a 20 psig pressure drop across the feed channel. A sample was pulled and a density measurement was performed to confirm the concentration
15 prior to recovery. The concentration of this sample was 191 g 2H7/L. Table 20 summarizes the throughput and flux results.

Table 20.

Process Phase	Normalized throughput (g/ft ² /hr)	Normalized Flux (LMH/psig)
UF1	67	3.6
DF	47	2.1
UF2	292	1.8

20 Just prior to product recovery, a 30 mL sample was pulled and submitted for detection and titer of bioburden. The results were negative (i.e., <0.13 CFU/mL). The protein pool was recovered by a series of steps as in Example 11. The volumes of the recovered pool, diluted pool, and conditioned pool were then analyzed for protein concentration. Table 21 presents the results. The membrane was
25 regenerated as in Example 11.

Table 21.

	Volume (L)	Concentration (g/L)	Mass (g)	Yield or {Loss} (%)
Q-Pool	196	5.106	1000	100
Recovered Pool	4.9	187.1	918.0	91.8
Diluted Pool	6.075	150.9	916.9	91.7

5 All publications, patents, and patent documents are incorporated by
reference herein in their entirety, as though individually incorporated by reference.
The disclosure has been described with reference to various specific and preferred
embodiments and techniques. However, it should be understood that many
variations and modifications can be made while remaining within the spirit and
10 scope of the disclosure.

THE CLAIMED INVENTION IS:

1. A process for preparing highly concentrated antibody compositions comprising:
 - a first ultrafiltering of a first antibody preparation to provide a second antibody preparation;
 - a diafiltering the second antibody preparation to provide a diafiltered intermediate antibody preparation; and
 - a second ultrafiltering of the diafiltered intermediate antibody preparation to provide a third antibody preparation;wherein one or more of the first ultrafiltering, second ultrafiltering, and the diafiltering are accomplished at about 30 °C to about 50°C.
2. The process of claim 1 wherein one or more of the first ultrafiltering, the second ultrafiltering, and the diafiltering are accomplished at from about 35 °C to about 50°C.
3. The process of claim 1 wherein one or more of the first ultrafiltering, the second ultrafiltering, and the diafiltering are accomplished at from about 45 °C.
4. The process of claim 1 wherein one or more of the first ultrafiltering, the second ultrafiltering, and the diafiltering are accomplished at 45 °C plus or minus 5°C.
5. The process of claim 1 wherein the first antibody preparation has an antibody concentration of from about 0.1 to about 10 grams per liter.
6. The process of claim 1 wherein the first antibody preparation has an antibody concentration of about 1 to about 5 grams per liter.
7. The process of claim 1 wherein the second antibody preparation has an antibody concentration of from about 10 to about 50 grams per liter.

8. The process of claim 1 wherein the second antibody preparation has an antibody concentration of about 20 to about 40 grams per liter.
9. The process of claim 1 wherein the third antibody preparation has an antibody concentration of from about 50 to about 250 grams per liter.
10. The process of claim 1 wherein the third antibody preparation has an antibody concentration of from about 100 to about 230 grams per liter.
11. The process of claim 1 wherein the third antibody preparation has an antibody concentration of from about 170 to about 200 grams per liter.
12. The process of claim 1 wherein the diafiltered intermediate antibody preparation and the third antibody preparation comprise the ultra-filter retentate.
13. The process of claim 1 wherein the intermediate antibody preparation has an antibody concentration of about 25 to about 35 grams per liter and the third antibody preparation has an antibody concentration of from about 170 to about 200 grams per liter.
14. The process of claim 1 wherein the antibody preparation comprises anti-IgE antibodies.
15. The process of claim 1 wherein the process is accomplished in from about 1 to 10 hours.
16. The process of claim 1 wherein the process is accomplished in from about 2 to 5 hours.
17. The process of claim 1 wherein the process is accomplished in about 3 hours.

70.56

18. The process of claim 1 wherein the first and the second ultrafiltering are accomplished with an ultra-filter membrane having a nominal pore size of about 5 to about 50 kilo Daltons.

19. The process of claim 1 wherein the first and the second ultrafiltering are accomplished with an ultra-filter membrane having a nominal pore size of about 10 to about 30 kilo Daltons.

20. The process of claim 1 wherein the first antibody preparation contains an antibody having an apparent molecular weight of about 100 to about 200 kilo Daltons.

21. The process of claim 1 wherein the first antibody preparation contains an antibody having an apparent molecular weight of about 150 kilo Daltons.

22. The process of claim 1 wherein the first ultrafiltering concentrates the first antibody preparation to provide the second antibody preparation having an antibody concentration of about 30 grams per liter and the second ultrafiltering concentrates the intermediate antibody preparation to provide the third antibody preparation having an antibody concentration of about 170 to about 200 grams per liter.

23. The process of claim 1 wherein the first ultrafiltering and the second ultrafiltering are accomplished with the same ultra-filter membrane.

24. The process of claim 1 wherein the first ultrafiltering and the second ultrafiltering are accomplished with a regenerated cellulose composite ultra-filter membrane.

25. The process of claim 1 wherein the diafiltering accomplishes a buffer exchange at constant volume, constant concentration, or both.

26. The process of claim 1 wherein the diafiltering accomplishes a buffer exchange of from about 5 to about 15 fold volumes.

27. The process of claim 1 wherein the diafiltering accomplishes a buffer exchange of from about 8 fold volumes.

28. The process of claim 1 wherein the diafiltering exchanges a first buffer for a second buffer.

29. The process of claim 28 wherein the first buffer comprises a mixture of aqueous sodium chloride and a TRIS buffer, and the second buffer comprises a mixture of aqueous histidine chloride and arginine chloride.

30. The process of claim 1 wherein the first ultrafiltering, the second ultrafiltering, and the diafiltering are accomplished with tangential flow filtration across an ultra-filter membrane.

31. The process of claim 1 wherein the first ultrafiltering, the second ultrafiltering, and the diafiltering are accomplished with tangential flow filtration across the same ultra-filter membrane.

32. The process of claim 1 wherein the yield of the third antibody preparation is greater than about 70 weight % based on the weight of antibodies in the first antibody preparation.

33. The process of claim 32 wherein the yield of the third antibody preparation is from about 80 to about 100 weight % based on the weight of antibodies in the first antibody preparation.

34. The process of claim 1 wherein the first ultrafiltering has a recirculation rate of from about 0.5 L/min/ft² to about 5 L/min/ft².

35. The process of claim 1 wherein the ultrafiltering and diafiltering are accomplished at a transmembrane pressure of from about 10 to about 50 p.s.i.

58

36. The process of claim 1 wherein there is provided an antibody concentrate with a detectable bio-burden of less than about 100 CFU/mL.

37. A process for concentrating proteins comprising:
a first ultrafiltering of a first protein mixture to provide a second protein mixture;
a diafiltering of the second protein mixture to provide a diafiltered protein mixture; and
a second ultrafiltering of the diafiltered protein mixture to provide a third protein mixture, wherein one or more of the first ultrafiltering, the diafiltering, and the second ultrafiltering are accomplished at from about 30 °C to about 50 °C.

59

FIG.1

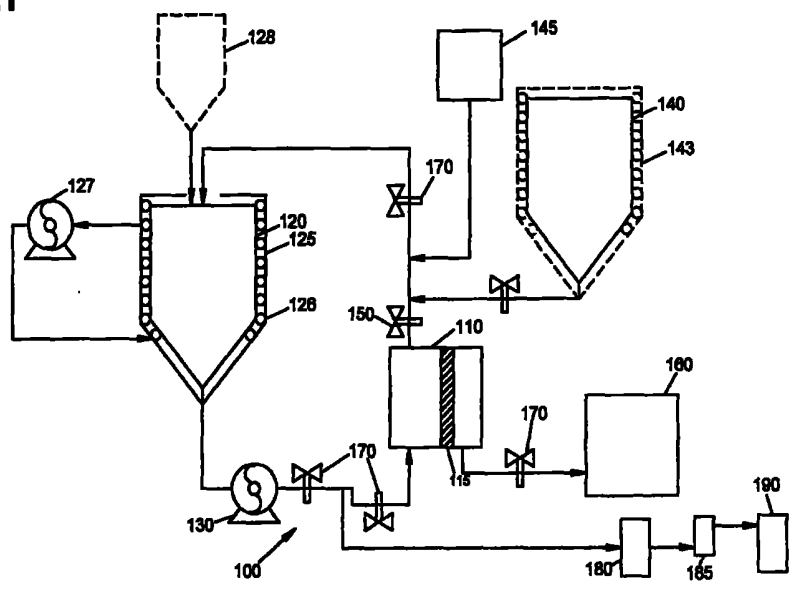


FIG.2

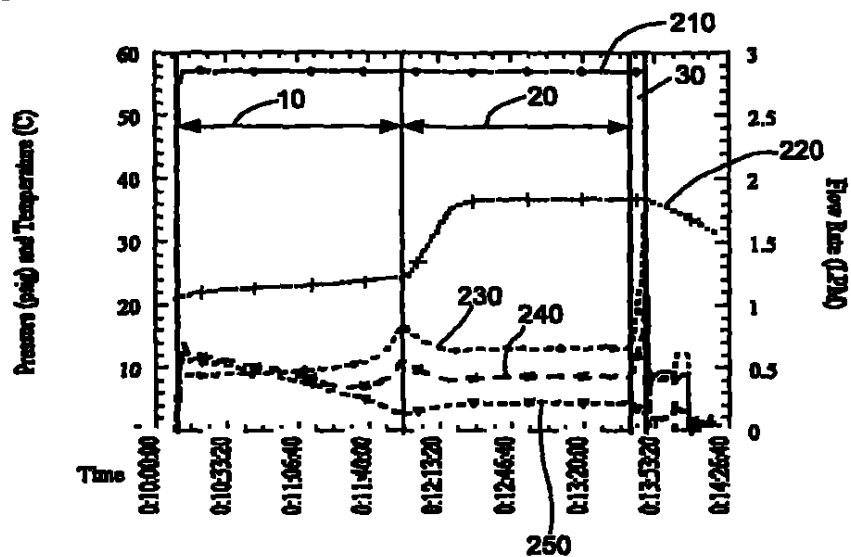


FIG.3

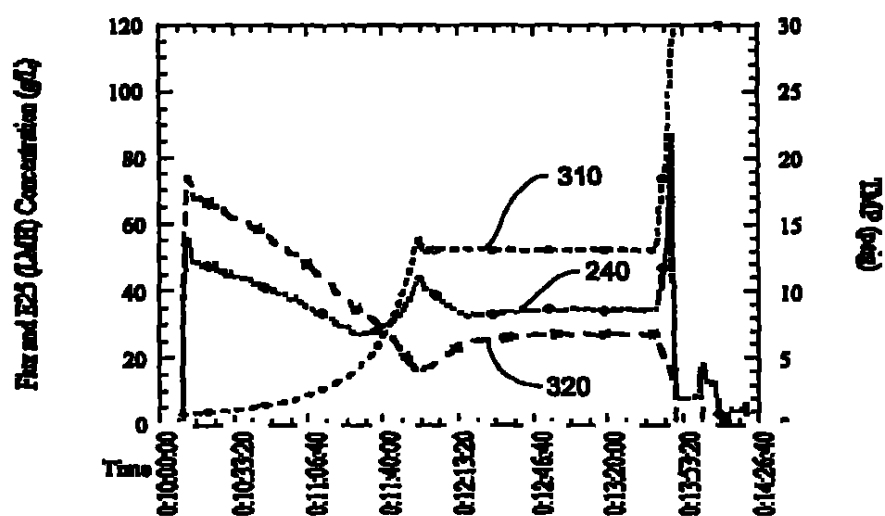


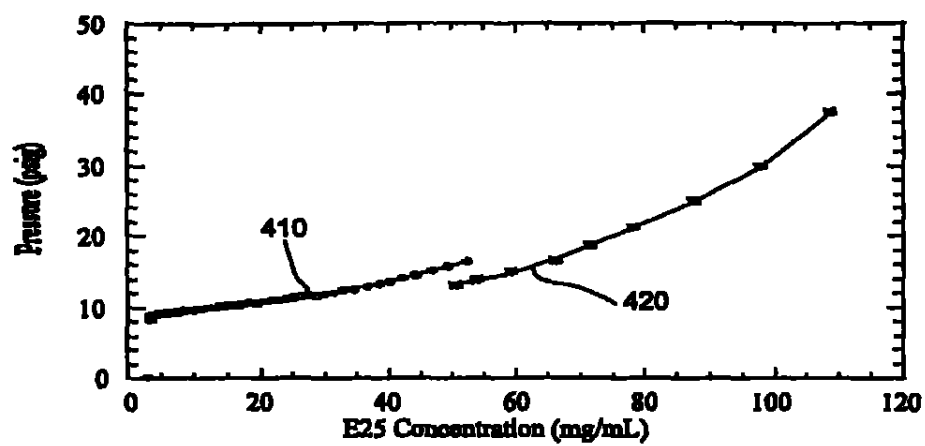
FIG.4

FIG.5

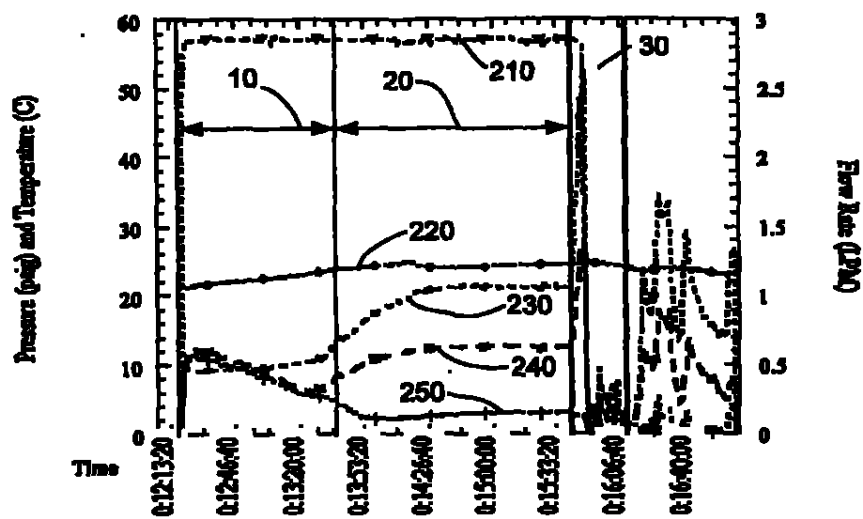


FIG.6

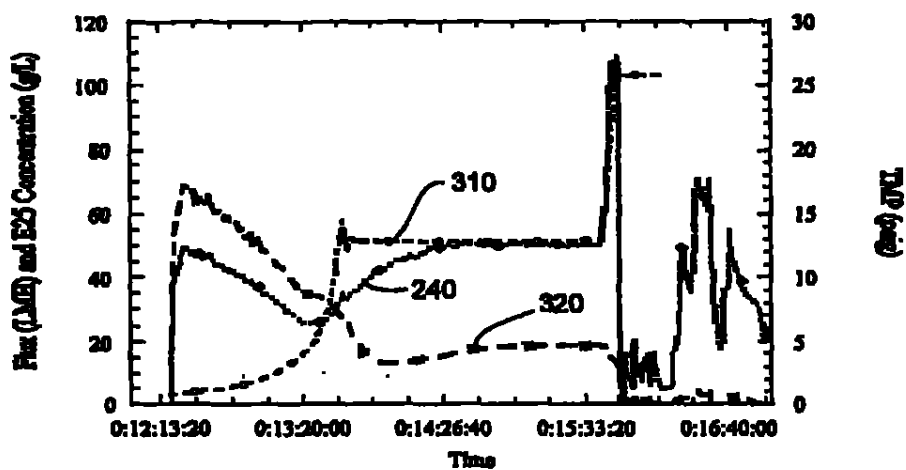


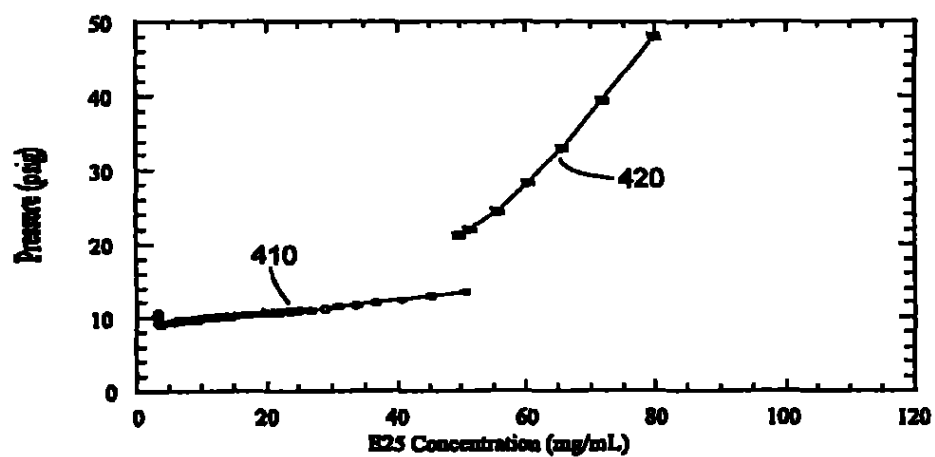
FIG.7

FIG.8

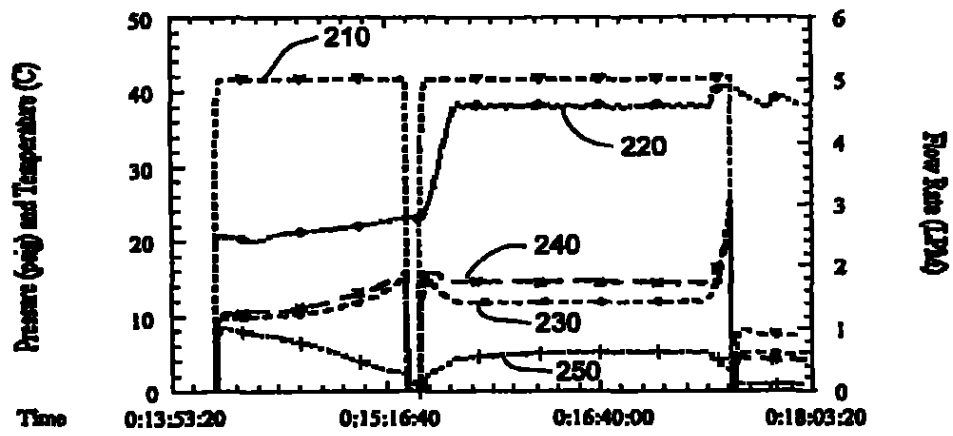


FIG.9

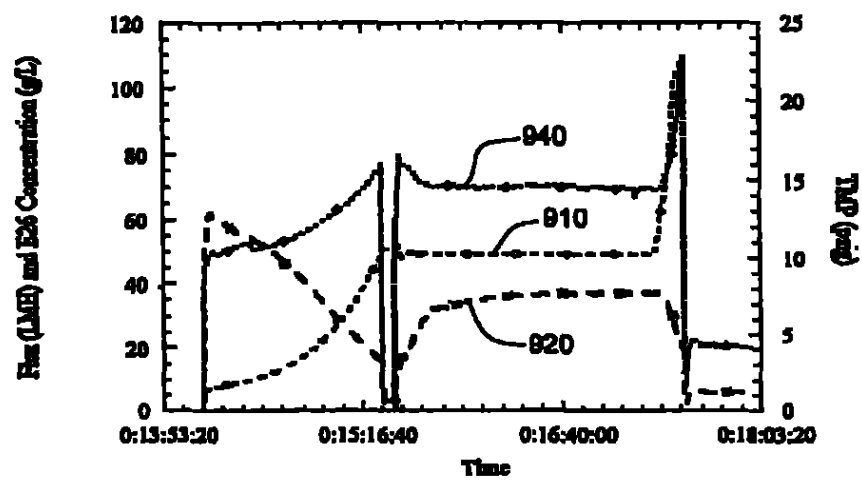


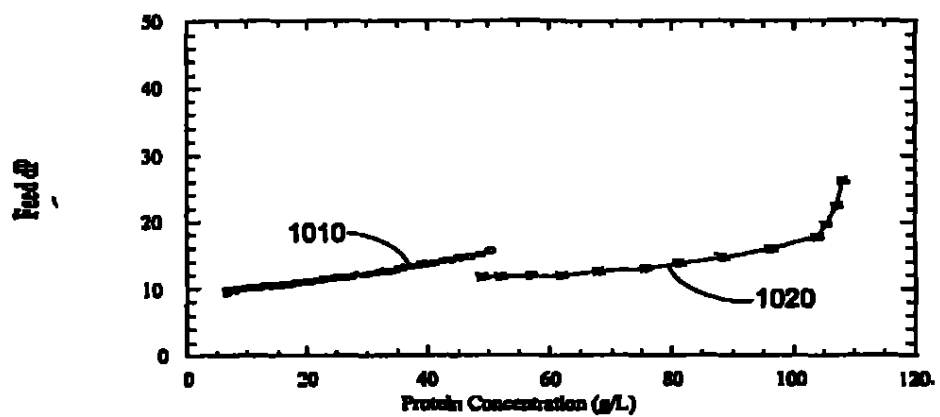
FIG.10

FIG.11

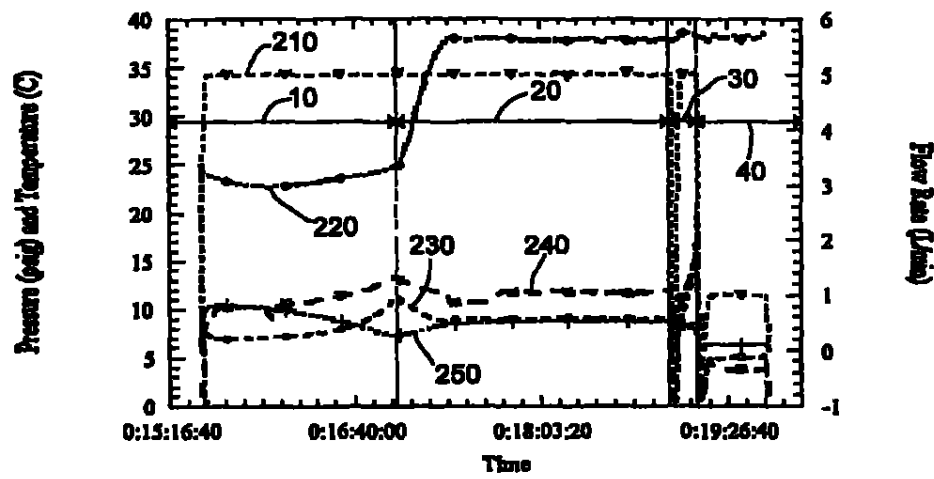


FIG.12

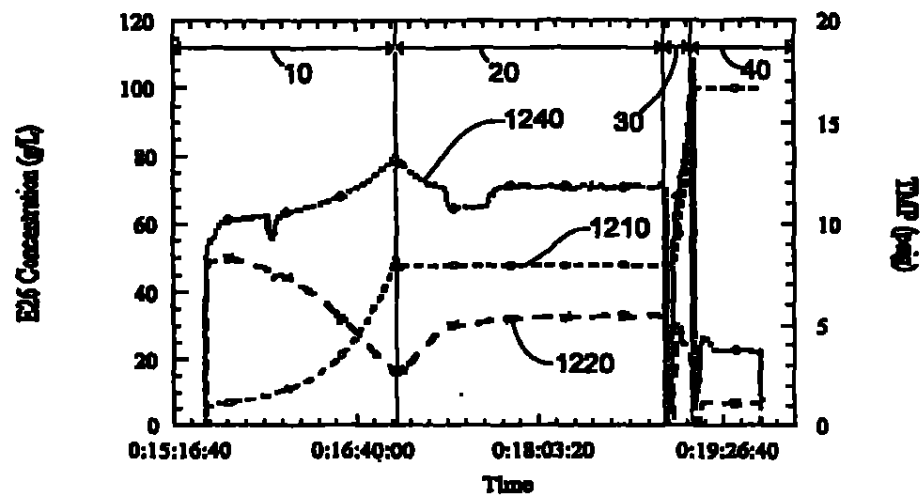
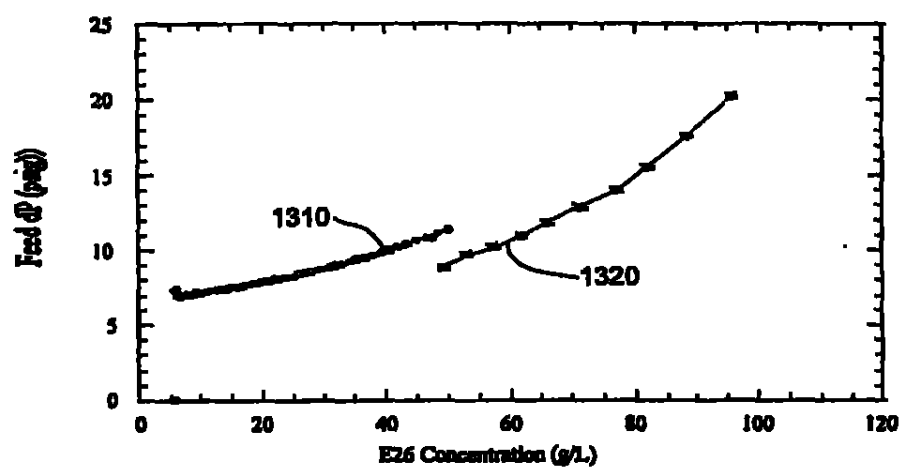


FIG.13

68

FIG.14

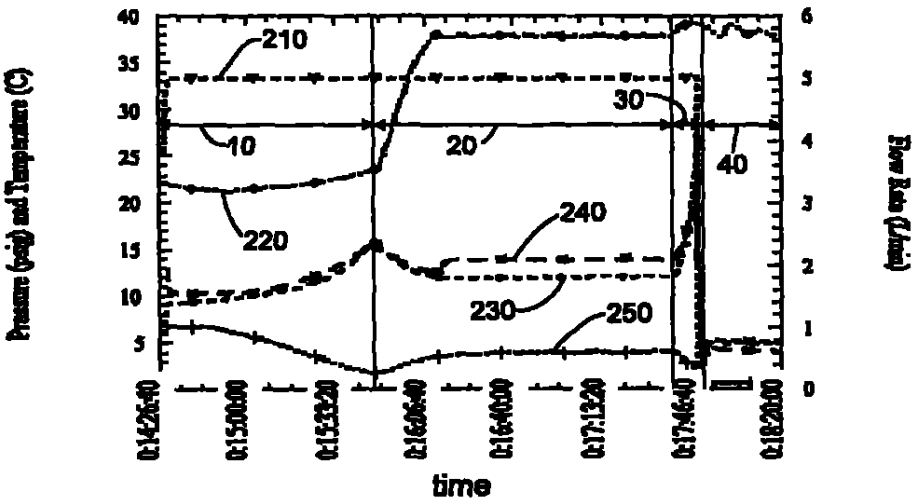


FIG.15

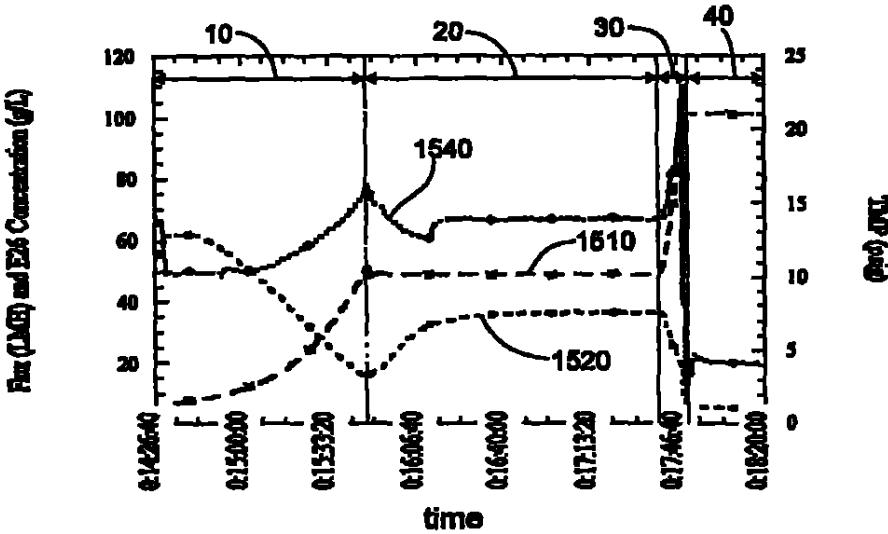


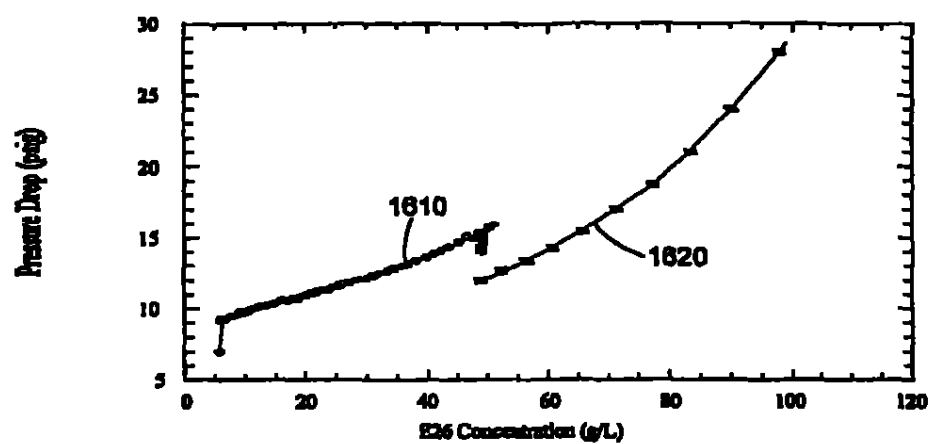
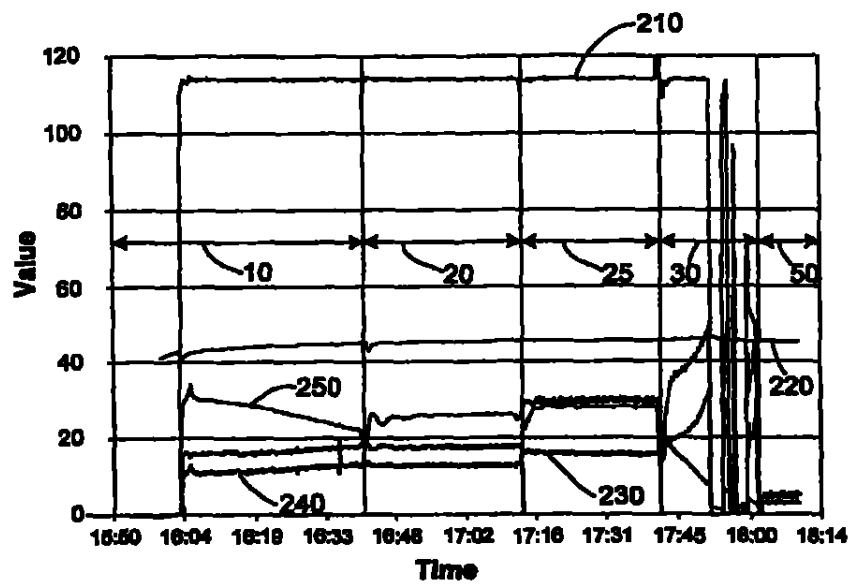
FIG.16

FIG.17



~~A~~ 71

FIG.18

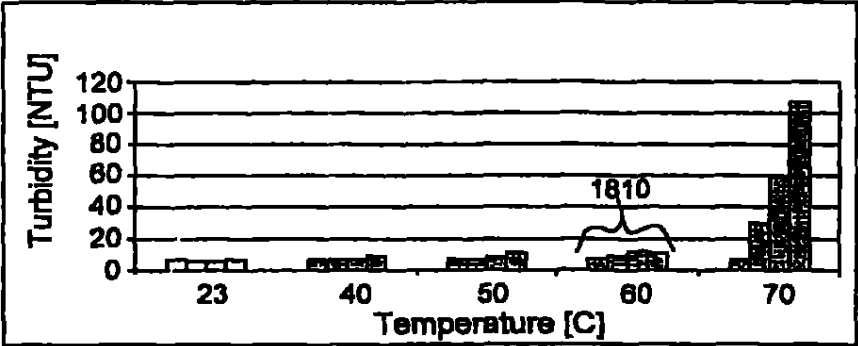
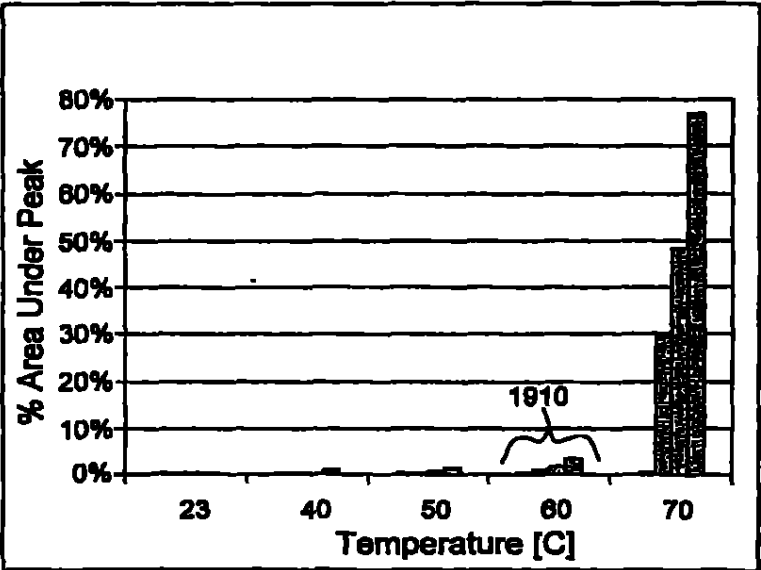


FIG.19



72

FIG.20

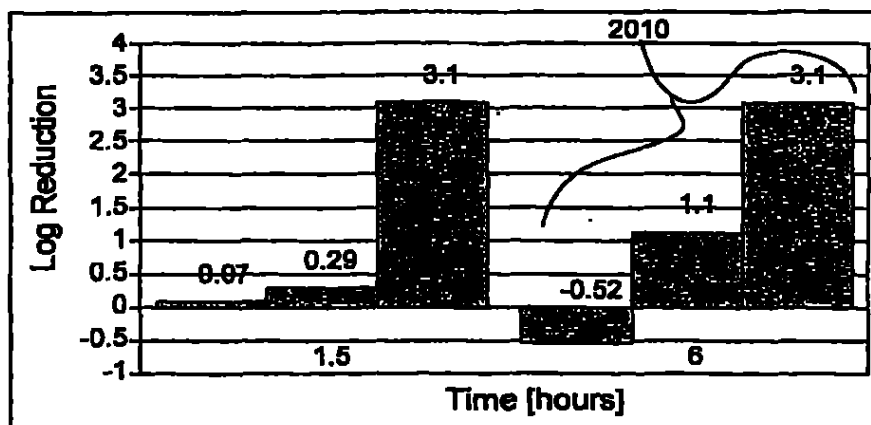


FIG.21

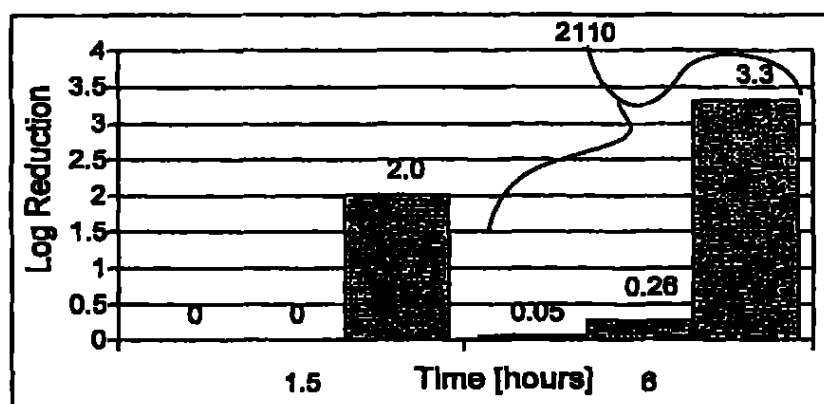


FIG.22

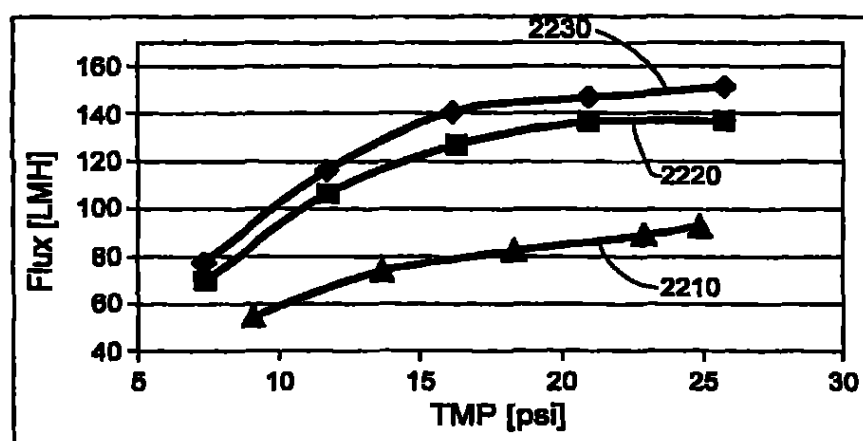


FIG.23

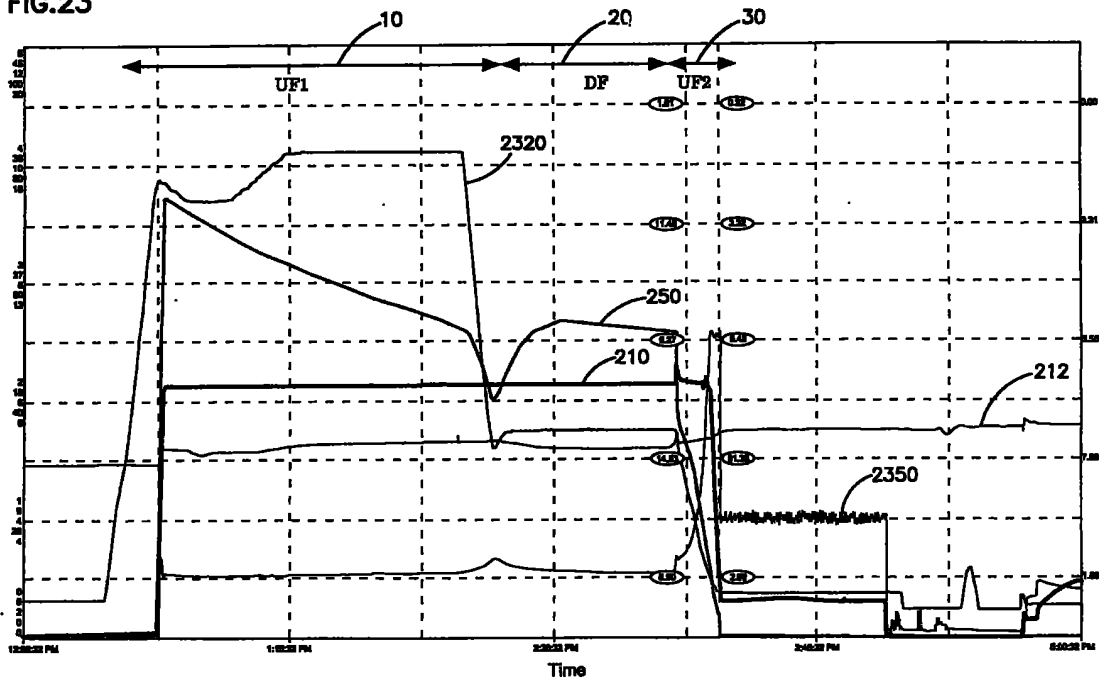


FIG.24

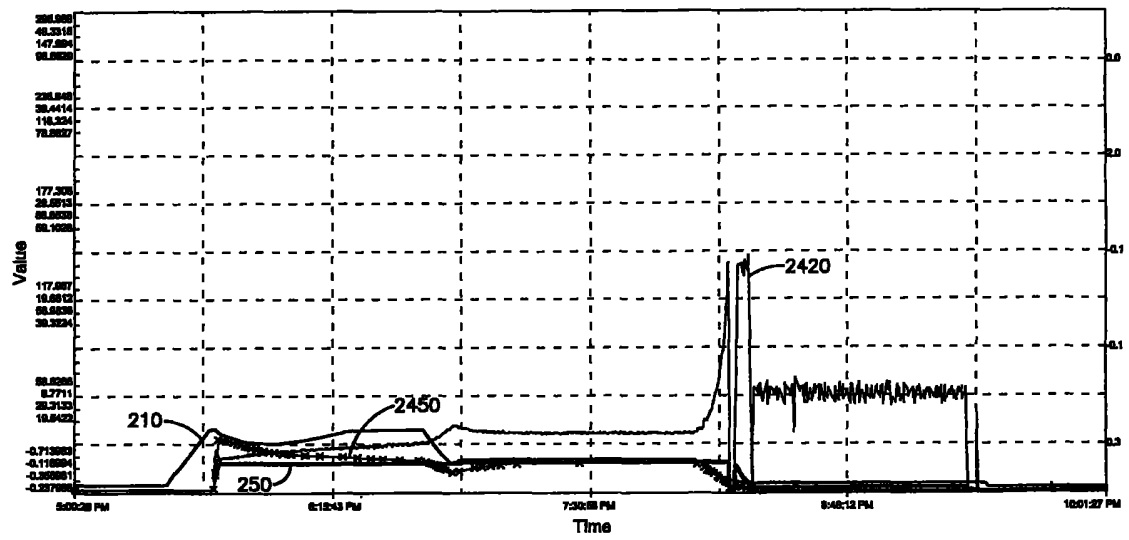
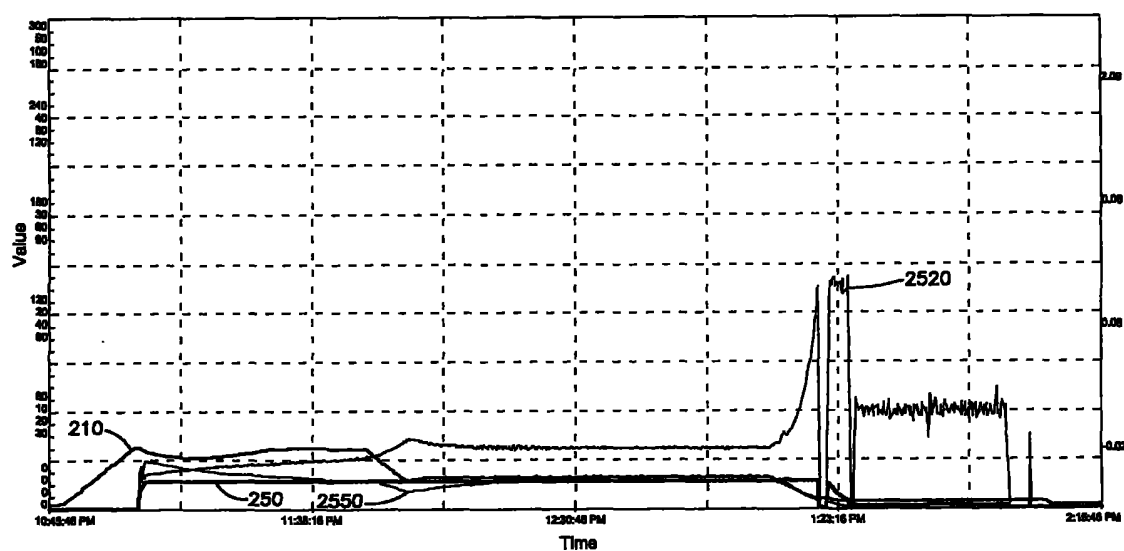


FIG.25



W 2006/031540

17/17

PCT/US2006/031544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K1/34		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K B01D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCHWARTZ L.: "Diafiltration: a fast, efficient, method for desalting, or buffer exchange of biological samples" [Online] 2003, PALL LIFE SCIENCES, XP002376846 Retrieved from the Internet: URL:Lab@pall.com> [retrieved on 2006-04-12] the whole document	1-37
Y	UNKNOWN: "Protein concentration and diafiltration by tangential flow filtration" [Online] 2003, MILLIPORE, XP002376847 Retrieved from the Internet: URL:www.millipore.com> [retrieved on 2006-04-12] the whole document	1-37
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 April 2006		Date of mailing of the international search report 27/04/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Rojo Romeo, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/031844

77

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/167320 A1 (COUTO DANIEL E ET AL) 26 August 2004 (2004-08-26) in particular par. 107, 165, 177, 179, 180 the whole document	1-37
Y	WO 2004/042012 A (BAYER HEALTHCARE LLC; KONSTANTINOV, KONSTANTIN; NGUYEN, HUONG, T; VOGEL) 21 May 2004 (2004-05-21) in particular example 7, the whole document	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2005/031844

78

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004167320 A1	26-08-2004	US 2005260672 A1	24-11-2005
WO 2004042012 A	21-05-2004	AU 2003287299 A1	07-06-2004
		CA 2504134 A1	21-05-2004
		EP 1596667 A2	23-11-2005
		JP 2006504525 T	09-02-2006

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
23 de Marzo de 2006 (23.03.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/031560 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 1/34 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional:
PCT/US2005/031844

(22) Fecha de Presentación Internacional:
8 de Septiembre de 2005 (08.09.2005)

(25) Lenguaje de entrega: Inglés

(26) Lenguaje de Publicación: Inglés

(30) Datos de la Prioridad:
80/809,092 9 de Septiembre de 2004 (09.09.2004) EU
11/220,362 8 de Septiembre de 2005 (08.09.2005) EU

(71) Solicitante (para todos los estados designados excepto US): GENENTECH, INC. [EU/EU]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US). NOVARTIS, AG [CH, CH]; Lichstrasse 35, Basel CH-4056 (CH)

(72) Inventores: e

(75) Inventores/solicitantes (solo para US): WINTER, Charles, Matthew [EU/EU]; 2433 Coronet Blvd., Belmont CA 94002 (EU).

(74) Agentes: NAIK, Paul; Genetech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (EU).

(51) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— con el informe de búsqueda internacional.

(88) Fecha de Publicación del Reporte de Búsqueda Internacional

24 de Agosto de 2006

Para códigos de dos letras y otras abreviaciones, referirse a las "Notas de guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada edición de la Gaceta del PCT

(54) Título: PROCESO PARA LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS Y PRODUCTOS TERAPEUTICOS DEL LOS MISMOS

(57) Resumen: La presente revelación proporciona un proceso para concentrar proteínas incluyendo una ultrafiltración, una diafiltración y una segunda secuencia de ultrafiltración, a temperaturas elevadas, tales como arriba de 30 °C. La revelación también incluye un proceso para preparar composiciones de anticuerpos altamente concentradas, y productos de anticuerpos altamente concentrados.

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.

82 82

Breve descripción de los dibujos

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

5 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.

10 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.

15 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

20 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:

25 "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

87 §3

sobre la base del tamaño y forma molecular, y lograr la separación de diferentes moléculas o lograr la concentración de moléculas similares.

5 "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.

10 "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.

15 "Anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (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
20 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.
25 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

28/84

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
5 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
10 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
15 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
20 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.

25 "Consistiendo esencialmente de" se refiere a un proceso para obtener una composición proteica concentrada o composición de anticuerpos que incluye los pasos e

8/85

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

86

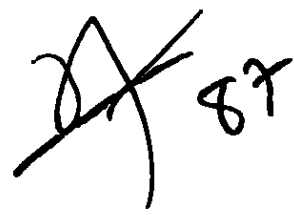
(g/L), para proveer una segunda preparación de anticuerpos como el retentado, que tiene una concentración de anticuerpos mayor de, por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 gramos por litro;

5 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

10 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
15 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
20 logrados a temperaturas mayores de aproximadamente 70 °C, la preparación puede mostrar signos de deterioro, tales como desnaturalización, aglomeración y fenómenos similares. Para
25



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

5 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

10 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.

15 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

20 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

25 aproximadamente 170 a aproximadamente 200 gramos por litro, tal como 185 gramos por litro.

7/88

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

24/89

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.

5 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
10 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
15 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;
20 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
25 (VEGF) y la solicitud de patente U.S. No. 2002/0122797 A1 (VEGF humano).

9D

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

91

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 multispecíficos 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 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, IgA1 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 intermediaria (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

96 95

(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

9b

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 antiIgE 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

~~87~~ 97

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
5 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
10 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
15 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),
20 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
25 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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 trasplante, 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

70/101

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 diavolúmenes (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.

102

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

5 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.

- 10 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 L/m²</u> <u>(L/ft²)</u>	<u>Solución (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

- 15 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});

624/104

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

5 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.

10 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 "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.

228/106

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 (1/2") 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

107
107

logró mediante el uso de glicol modulado en temperatura alimentado en la camisa de aislamiento del tanque.

5 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
10 (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
15 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
20 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
25 (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

~~108~~ 108

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 diavolúmenes 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/m ² /s (g/ft ² /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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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.

110

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

5 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

10 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

15 3.

~~2/4~~ III

Tabla 3.

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

Ejemplo comparativo 2

5 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

~~112~~ 112

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

5 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

10 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

15 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.

20

Tabla 4.

Fase de proceso	Rendimiento normalizado g/m ² /s (g/ft ² /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)

113

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).

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 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

115

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

HP 116

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/m ² /s (g/ft ² /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

117

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
5 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

10

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)
15 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

5 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

15 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
20 rendimiento y flujo de UF1, DF y UF2.

Tabla 10.

Fase de proceso	Rendimiento normalizado g/m ² /s (g/ft ² /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 5 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

10 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

~~1220~~ 120

(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 cromatografia 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/m ² /s (g/ft ² /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)
UF2	0,54 (180,5)	0,15 (1,57)

12/12/21

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.

7/12/12

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.

5

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
10 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
15 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
20 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
25 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)

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

125

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

126/126

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

5

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

10 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

15 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

20 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

25 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

127
127

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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.

177
128

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)

5 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
10 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
15 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
20 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

5 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

10 **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

15 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 (1/2"), 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 calda a baja presión en donde la bomba de alimentación se controló para mantener una calda 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/m ² /s (g/ft ² /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

~~134~~ 134

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.

- 5 Después del proceso, la membrana se regeneró usando un paso único de lavado de 0,1 N de NaOH, $10,8 \text{ L/m}^2$ (1 L/ft^2) seguido por $5,4 \text{ L/m}^2$ ($0,5 \text{ L/ft}^2$) de recirculación total durante 30 minutos. Esto fue seguido por $10,8 \text{ L/m}^2$ (1 L/ft^2) de lavado de agua purificada. Esto fue seguido por una recirculación total de $5,4 \text{ L/m}^2$ ($0,5 \text{ L/ft}^2$) de 14 % de solución de Minncare durante 30 minutos. El sistema se lavó nuevamente con $10,8 \text{ L/m}^2$ (1 L/ft^2) de agua purificada
- 10 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-
- 15 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
- 20 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
- 25 superior y la temperatura se mantuvo a 40-50 °C.

126
136

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)

✓ 137

5 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).

10 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

15 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

147
138

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
5 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 el tiempo: el nivel
10 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 diavolumenes (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
15 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
20 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.

25

~~139~~ 139

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

10

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

~~140~~ 140

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.

141

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar composiciones de anticuerpos altamente concentrados **CARACTERIZADO** porque comprende:

una primera ultrafiltración de una primera preparación de anticuerpos para obtener una segunda preparación de anticuerpos;

una diafiltración de la segunda preparación de anticuerpos para obtener una preparación de anticuerpos intermediaria diafiltrada; y

una segunda ultrafiltración de la preparación de anticuerpos intermediaria diafiltrada para obtener una tercera preparación de anticuerpos;

en donde, una o más de la primera ultrafiltración, segunda ultrafiltración, y la diafiltración se logran de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **CARACTERIZADO** porque una o más de la primera ultrafiltración, segunda ultrafiltración, y diafiltración se logran de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **CARACTERIZADO** porque una o más de la primera ultrafiltración, segunda ultrafiltración, y diafiltración se logran de aproximadamente 45 °C.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **CARACTERIZADO** porque una o más de la primera ultrafiltración, segunda ultrafiltración, y diafiltración se logran de aproximadamente 45 °C, más o menos 5 °C.

179
142

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 gramos por litro.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 gramos por litro.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la segunda preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 gramos por litro.

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la segunda preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 gramos por litro.

9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 gramos por litro.

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 100 a aproximadamente 230 gramos por litro.

~~157~~ 143

11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la tercera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 170 a aproximadamente 200 gramos por litro.

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque preparación de anticuerpos intermediaria diafiltrada y la tercera preparación de anticuerpos comprende el retentado de ultrafiltro.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la preparación de anticuerpos intermediaria tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 gramos por litro, y la tercera preparación de anticuerpos tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 170 a aproximadamente 200 gramos por litro.

14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la preparación de anticuerpos comprende anticuerpos antiIgE.

15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el proceso se logra en aproximadamente de 1 a 10 horas.

16. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el proceso se logra en aproximadamente de 2 a 5 horas.

17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el proceso se logra en aproximadamente 3 horas.

~~13~~ / 144

18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera y la segunda ultrafiltración se logran con una membrana ultrafiltro que tiene un tamaño de poro nominal de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kilo Daltons.

19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera y la segunda ultrafiltración se logran con una membrana ultrafiltro que tiene un tamaño de poro nominal de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 kilo Daltons.

20. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera preparación de anticuerpos contiene un anticuerpo que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 kilo Daltons.

21. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera preparación de anticuerpos contiene un anticuerpo que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilo Daltons.

22. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera ultrafiltración concentra la primera preparación de anticuerpos para obtener 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 para obtener la tercera preparación de anticuerpos que tiene una concentración de anticuerpos de aproximadamente 170 a aproximadamente 200 gramos por litro.

~~27~~ 145

23. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera ultrafiltración y la segunda ultrafiltración se logran con la misma membrana ultrafiltro.

24. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera ultrafiltración y la segunda ultrafiltración se logran con una membrana ultrafiltro con componente de celulosa regenerada.

25. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la diafiltración logra un intercambio de buffer a volumen constante, concentración constante, o ambas.

26. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la diafiltración logra un intercambio de buffer en un volumen de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 veces mayor.

27. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la diafiltración logra un intercambio de buffer en un volumen de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 veces mayor.

28. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la diafiltración intercambia un primer buffer por un segundo buffer.

29. El proceso de acuerdo con la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque el primer buffer comprende una mezcla de cloruro de sodio acuoso y un buffer de TRIS buffer,

1.170
146

y el segundo buffer comprende una mezcla de cloruro de histidina y cloruro de arginina acuosos.

30. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera ultrafiltración, la segunda ultrafiltración, y la diafiltración se logran con filtración de flujo tangencial a través de una membrana ultrafiltro.

31. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera ultrafiltración, la segunda ultrafiltración, y la diafiltración se logran con filtración de flujo tangencial a través de la misma membrana ultrafiltro.

32. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el rendimiento de la tercera preparación de anticuerpos es superior a aproximadamente 70 % en peso sobre la base del peso de los anticuerpos en la primera preparación de anticuerpos.

33. El proceso de acuerdo con la reivindicación 32, CARACTERIZADO porque el rendimiento de la tercera preparación de anticuerpos es de aproximadamente 80 a aproximadamente 100 % en peso sobre la base del peso de los anticuerpos en la primera preparación de anticuerpos.

34. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la primera ultrafiltración tiene una tasa de recirculación de aproximadamente $0,09 \text{ L/s/m}^2$ ($0,5 \text{ L/min/ft}^2$) a aproximadamente $0,9 \text{ L/s/m}^2$ (5 L/min/ft^2).

12/147

35. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la ultrafiltración y diafiltración se logran a presiones transmembrana de aproximadamente 68,9 kPa (10 p.s.i.) a aproximadamente 344,7 kPa (50 p.s.i.).

36. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque se obtiene un concentrado de anticuerpos con una biocarga detectable inferior a aproximadamente 100 UFC/mL.

37. Un proceso para concentrar proteínas CARACTERIZADO porque comprende:

una primera ultrafiltración de una primera mezcla proteica para obtener una segunda mezcla proteica;

una diafiltración de la segunda mezcla proteica para obtener una mezcla proteica diafiltrada; y

una segunda ultrafiltración de la mezcla proteica diafiltrada para obtener una tercera mezcla proteica;

en donde, una o más de la primera ultrafiltración, la diafiltración, y la segunda ultrafiltración se logran de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C.

FIG 1

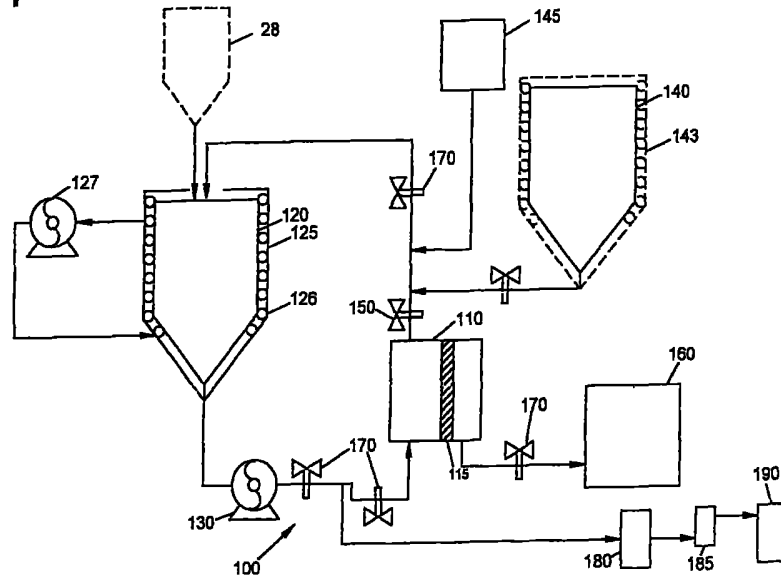


FIG.2

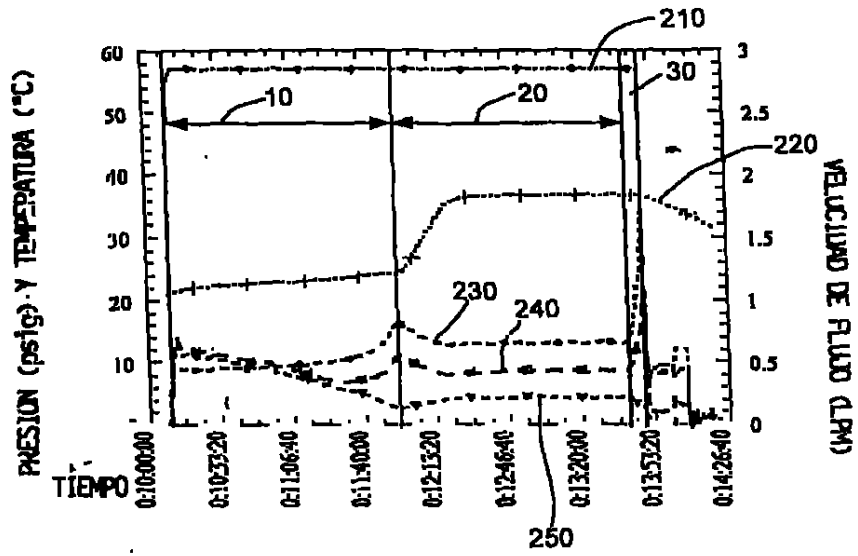
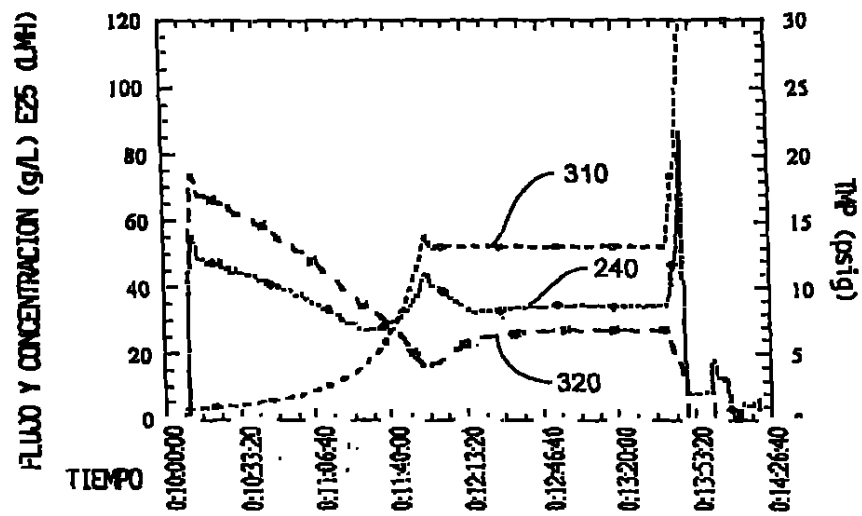
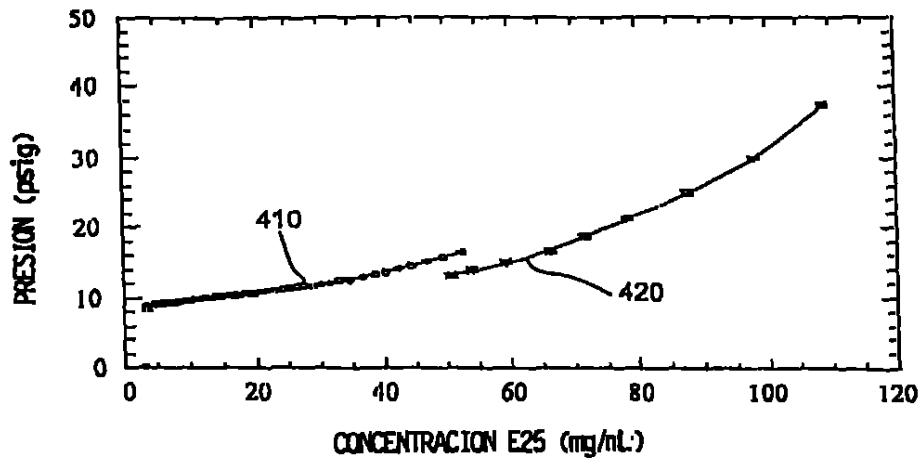


FIG.3



~~100~~
150

FIG.4



10/151

FIG.5

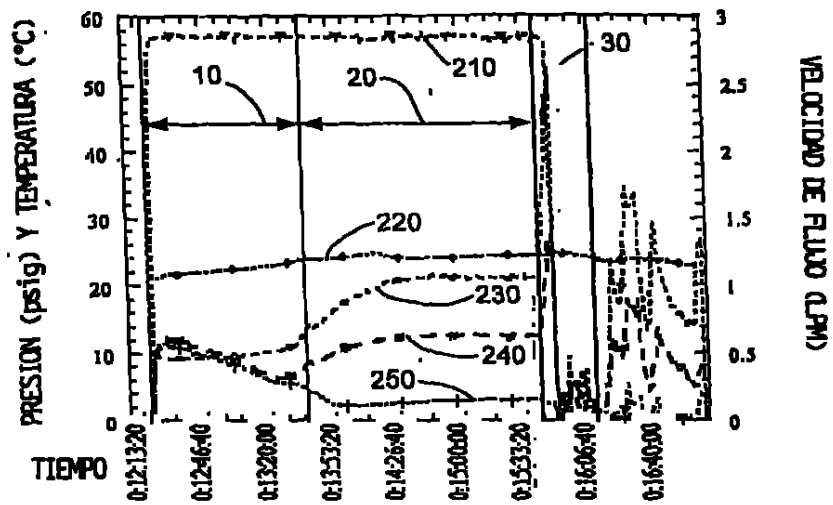
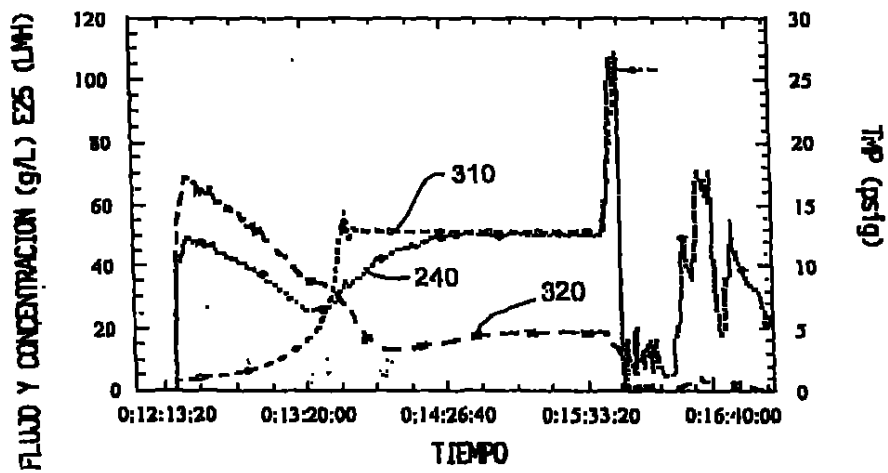
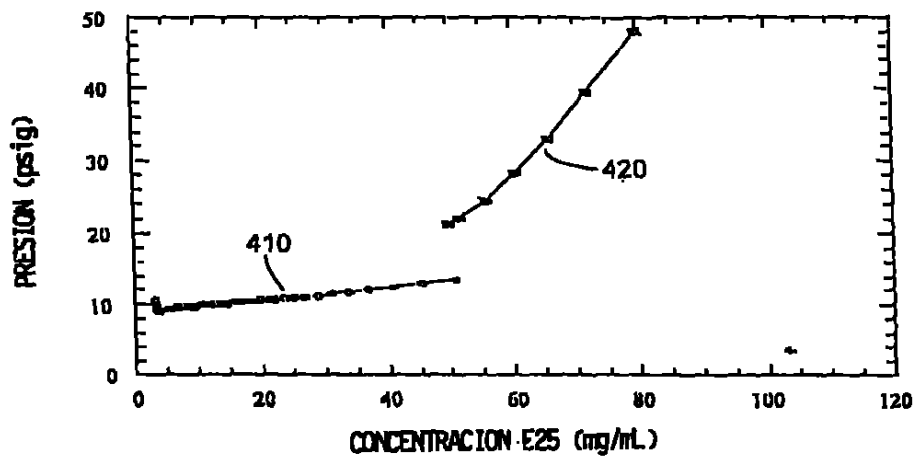


FIG.6



102/152

FIG.7



~~153~~ 153

FIG.8

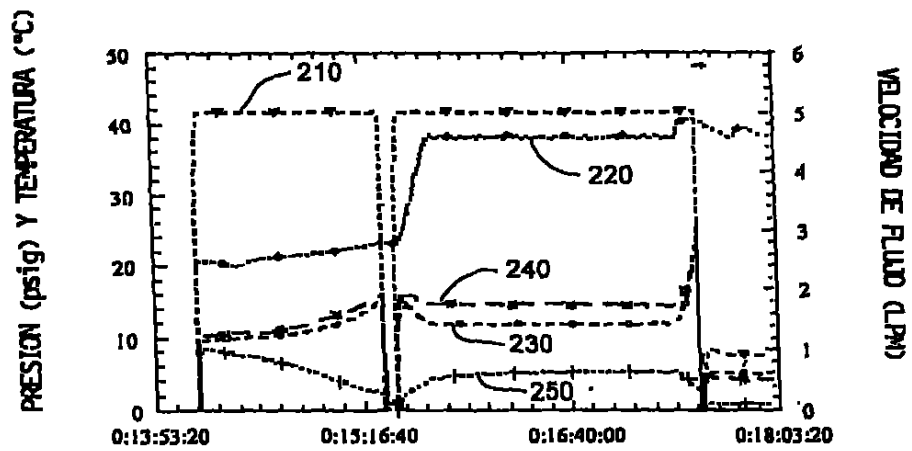


FIG.9

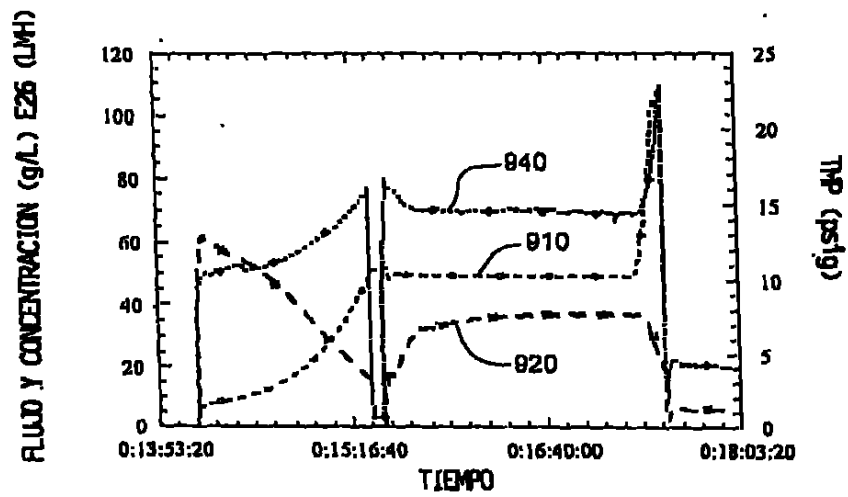
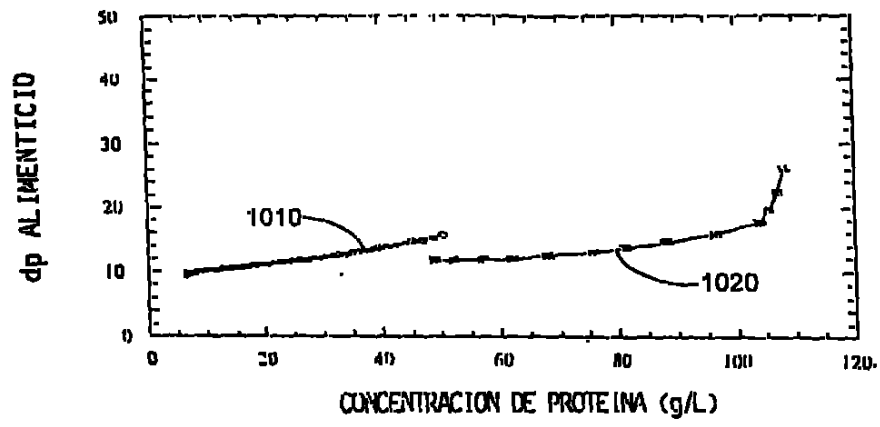


FIG.10



10/155

FIG.11

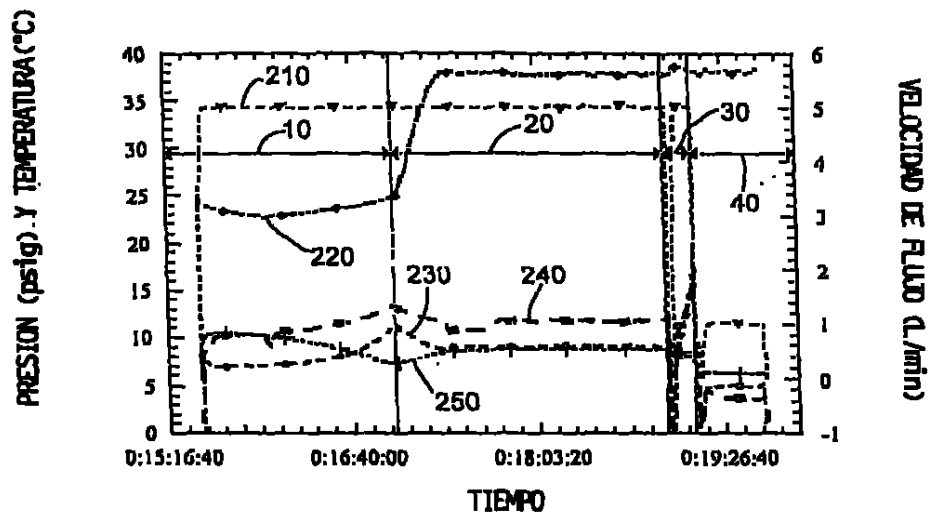
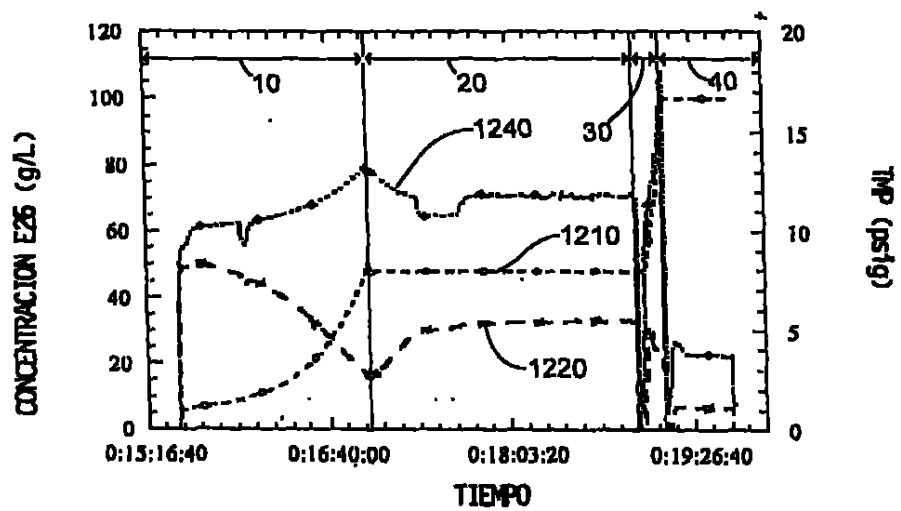
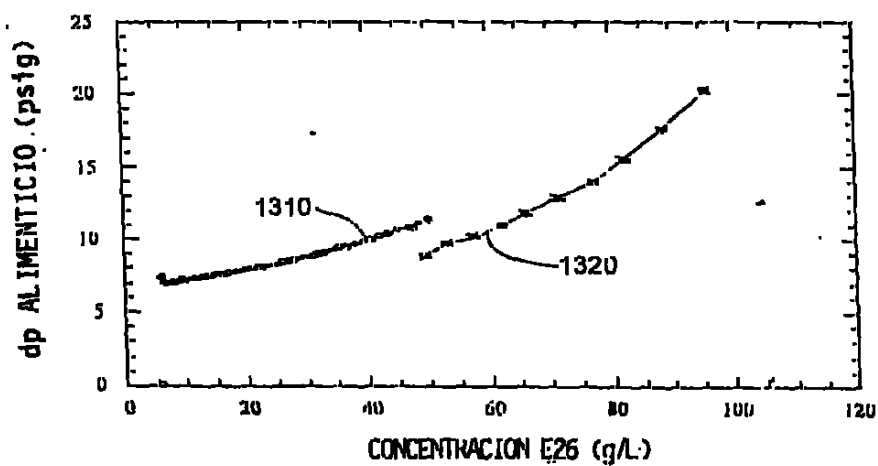


FIG.12



~~116~~ 156

FIG.13



16/157

FIG.14

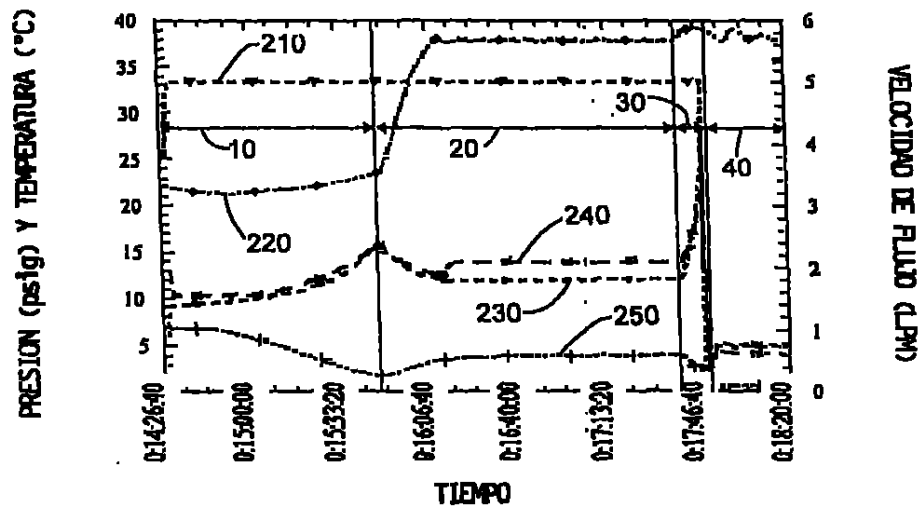
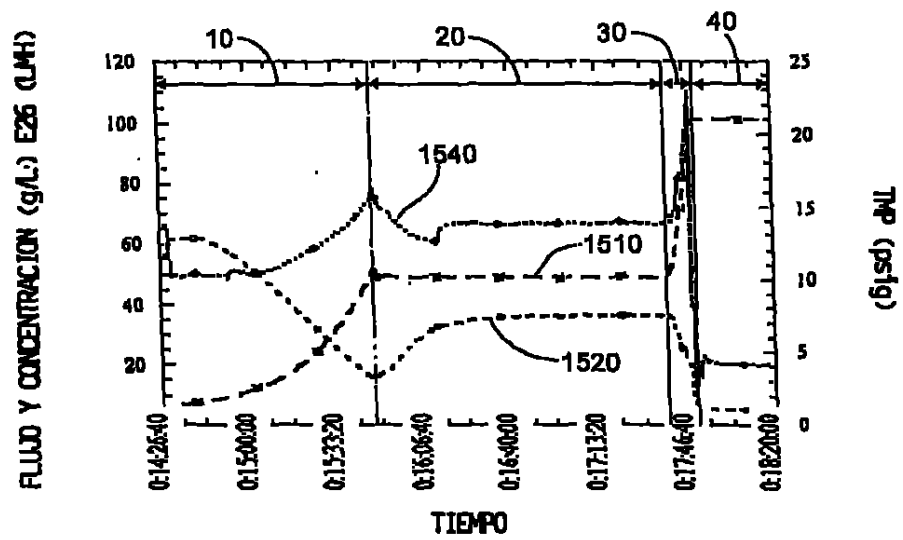
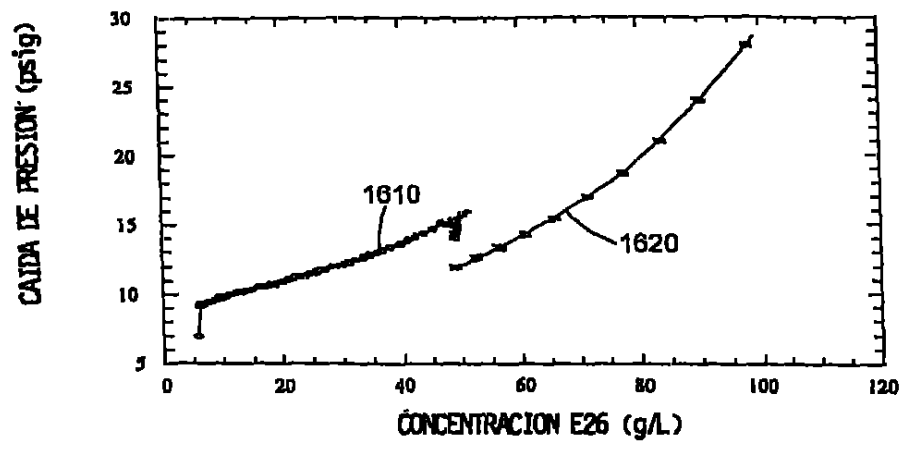


FIG.15



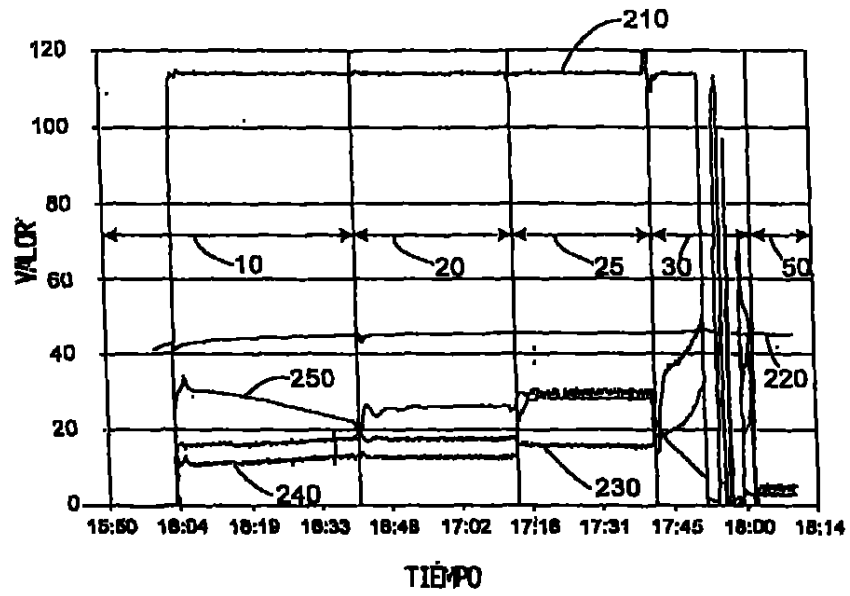
158

FIG.16



109
159

FIG.17



120
160

FIG.18

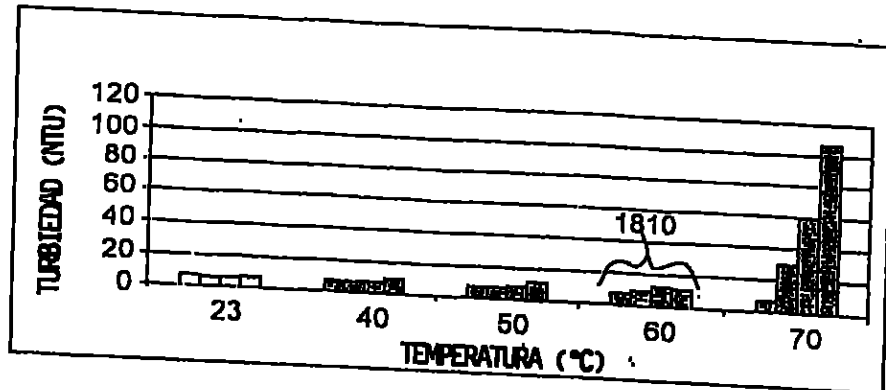


FIG.19

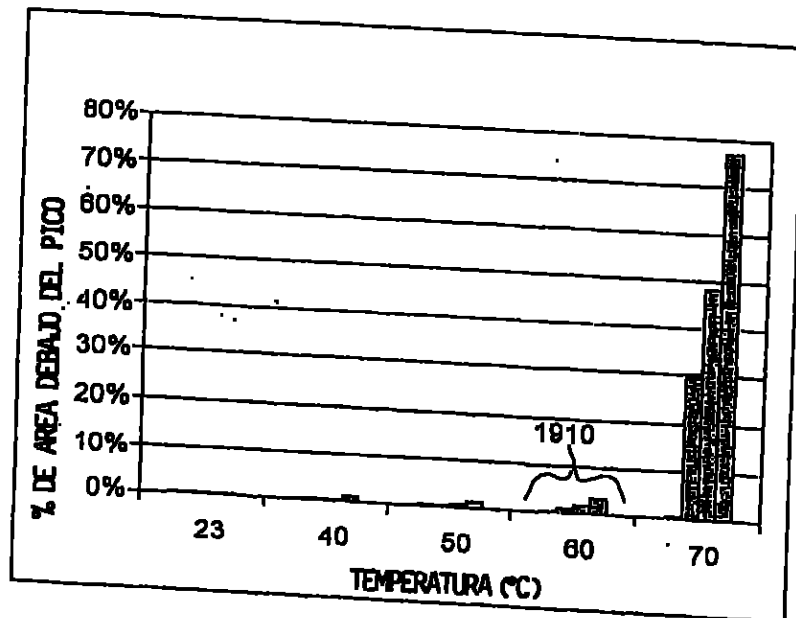


FIG.20

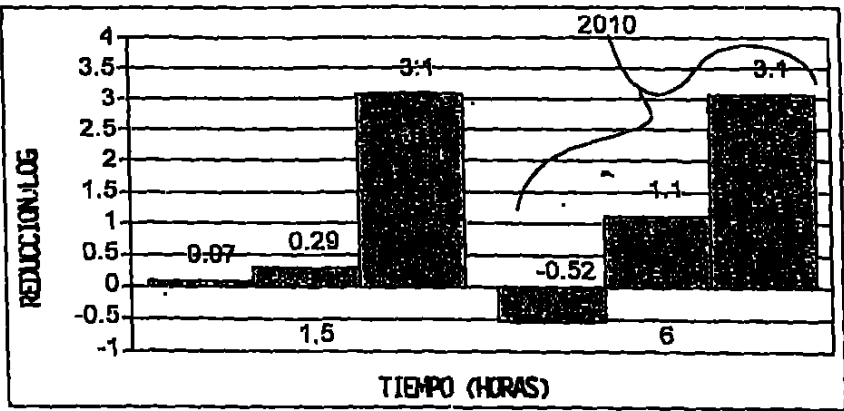


FIG.21

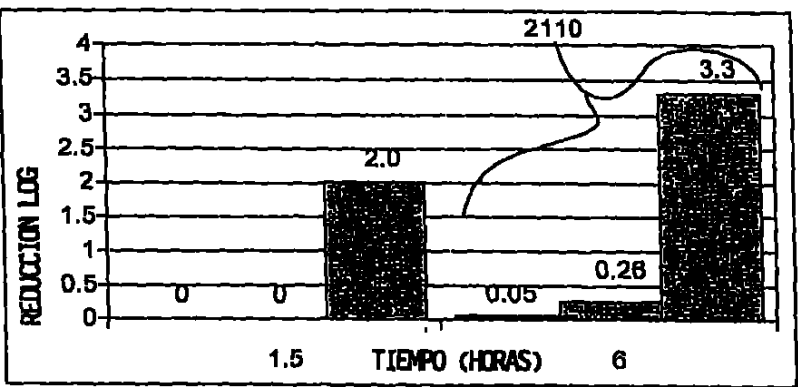


FIG.22

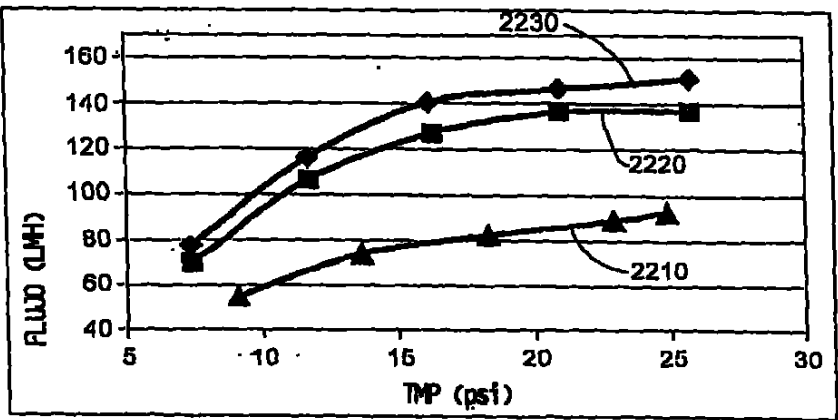


FIG 23

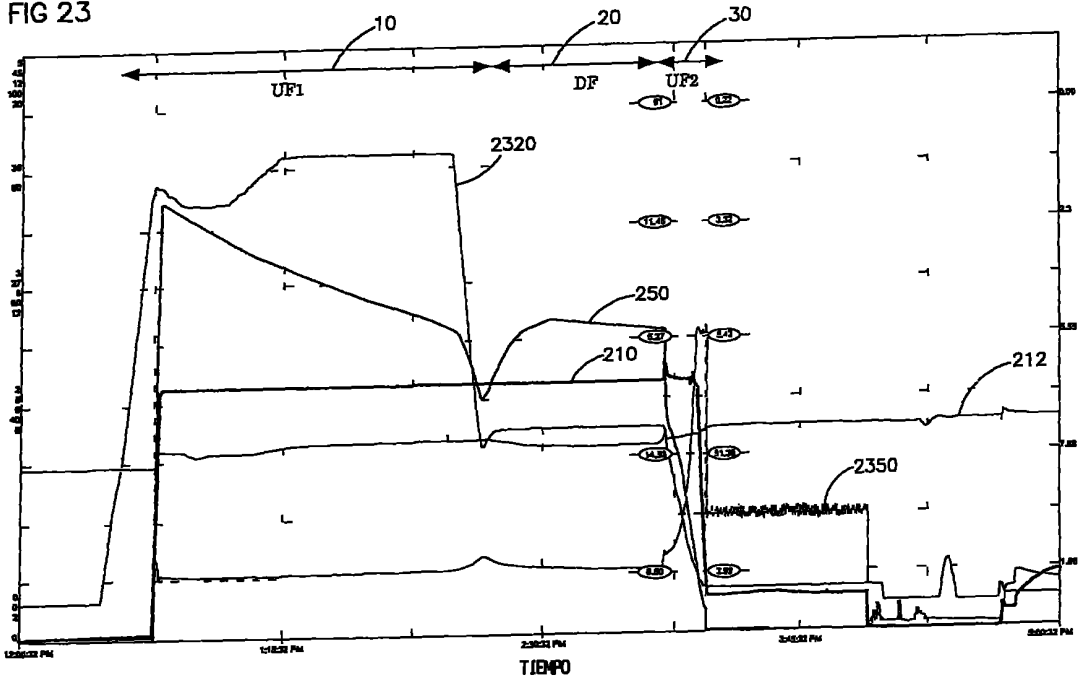


FIG 24

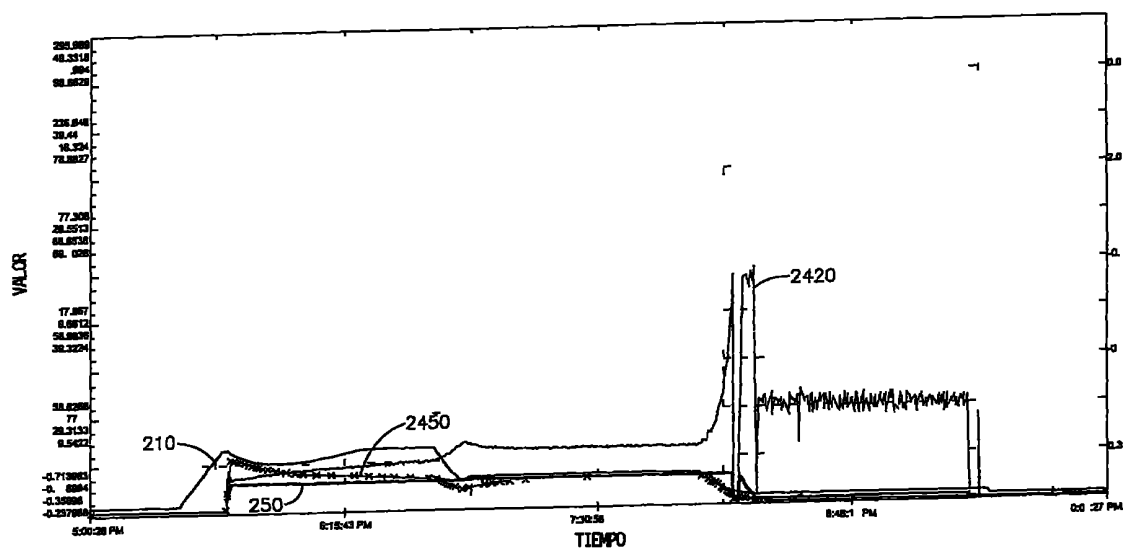
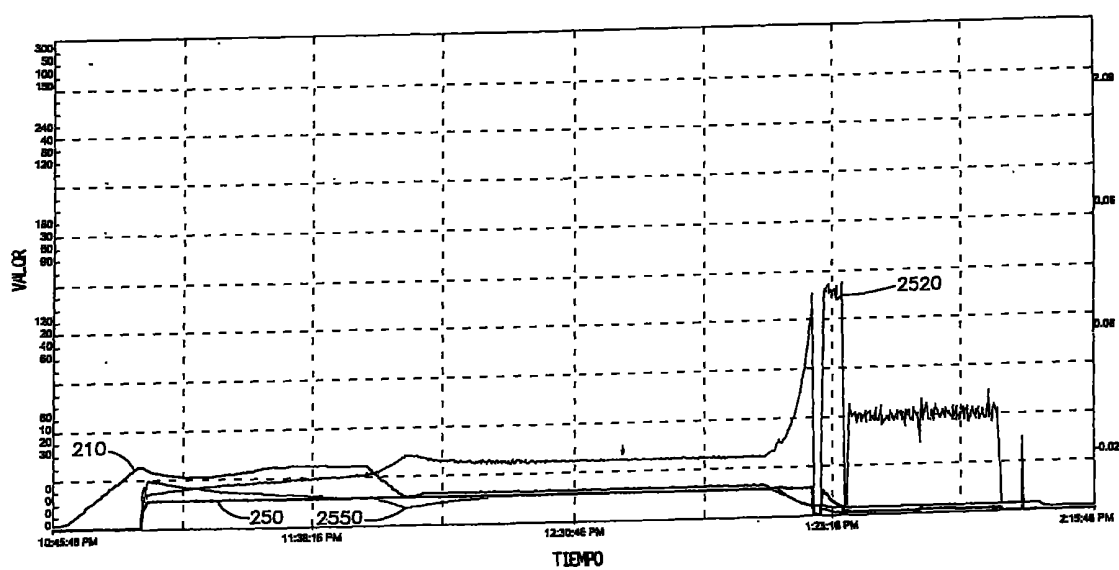


FIG.25



From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED**

To:

BRUESS, Steven, C.
Merchant & Gould P.C.
P.O. Box 2903
Minneapolis, MN 55402-0903
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)
23 March 2006 (23.03.2006)

Applicant's or agent's file reference
11669.153WOU1

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2005/031844

International filing date (day/month/year)
08 September 2005 (08.09.2005)

Priority date (day/month/year)
09 September 2004 (09.09.2004)

Applicant
GENENTECH, INC. et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

- ☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 23 March 2006 (23.03.2006) under No. WO 2006/031560
- ☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO
- For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Yoshiko Kuwahara

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 90 90

165

166

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 19 December 2005 (19.12.2005)		To: BRUESS, Steven, C. Merchant & Coud P.C. P.O. Box 2903 Minneapolis, MN 55402-0903 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
Applicant's or agent's file reference 11069.153WOU1		
International application No. PCT/US2005/031844	International filing date (day/month/year) 08 September 2005 (08.09.2005)	
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 09 September 2004 (09.09.2004)	
Applicant GENENTECH, INC. et al		

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
09 September 2004 (09.09.2004)	60/609,082	US	07 November 2005 (07.11.2005)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Sean M. Taylor Facsimile No. (41-22) 338.90.90 Telephone No. +41 22 338 9811
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 26bis.1 and 26bis.2 and
Administrative Instructions, Sections 402(c) and 409)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BRUESS, Steven, C.
Merchant & Could P.C.
P.O. Box 2903
Minneapolis, MN 55402-0903
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 20 December 2005 (20.12.2005)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 11889.153WOU1	
International application No. PCT/US2005/031844	International filing date (day/month/year) 08 September 2005 (08.09.2005)
Applicant GENENTECH, INC. et al	

The applicant is hereby notified of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application.

1. ☒ **Correction of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: 09 November 2005 (09.11.2005), the following priority claim has been corrected, according to paragraph 176 of the PCT Receiving Guidelines where application, to read as follows:
- US 06 September 2005 (06.09.2005) 11/220,362
- ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
- ☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
2. ☐ **Addition of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: , the following priority claim has been added:
- ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
- ☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
3. ☒ **As a result of the correction and/or addition of (a) priority claim(s) under items 1 and/or 2, the (earliest) priority date is:**
- 09 September 2004 (09.09.2004)
4. ☐ **Priority claim considered not to have been made.**
- ☐ The applicant failed to respond to the invitation under Rule 26bis.2(a) (Form PCT/IB/316) within the prescribed time limit.
- ☐ The applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a).
- ☐ The applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10.
- The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish, together with the international application, information concerning the priority claim. See Rule 26bis.2(a) and the PCT Applicant's Guide, Volume I, Annex B2(IIB).
6. ☐ Where multiple priorities have been claimed, the above item(s) relate(s) to the following priority claim(s):
6. A copy of this notification has been sent to the receiving Office and
- ☒ to the International Searching Authority (where the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have not yet been issued).
- ☐ the designated Offices (in accordance with Rule 83bis).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Sean M. Taylor
Facsimile No. (41-22) 338.90.90	Telephone No. (41-22) 338 9811

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

PCT

NOTIFICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION NUMBER AND OF THE
INTERNATIONAL FILING DATE

(PCT Rule 20.5(c))

To:

STEVEN C. BRUESS
MERCHANT & GOULD P.C.
P.O. BOX 2803
MINNEAPOLIS, MINNESOTA 55402-0803Date of mailing
(day month year)

22 Nov 2005

Applicant's or agent's file reference

11669.153

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US2005/031844

International filing date (day month year)

-06 Sep 2005

Priority date (day month year)

09 Sep 2004

Applicant

GENENTECH, INC.

Title of the invention

PROCESS FOR CONCENTRATION OF ANTIBODIES AND THERAPEUTIC PRODUCTS THEREOF

1. The applicant is hereby notified that the international application has been accorded the international application number and the international filing date indicated above.

2. The applicant is further notified that the record copy of the international application:



was transmitted to the International Bureau on

22 Nov 2005



has not yet been transmitted to the International Bureau for the reason indicated below and a copy of this notification has been sent to the International Bureau*:



because the necessary national security clearance has not yet been obtained.



because (reason to be specified):

* The International Bureau monitors the transmittal of the record copy by the receiving Office and will notify the applicant (with Form PCT/IB/301) of its receipt. Should the record copy not have been received by the expiration of 14 months from the priority date, the International Bureau will notify the applicant (Rule 22.1(c)).

3. FOREIGN TRANSMITTAL LICENSE INFORMATION

Completed by: ES



Additional license for foreign transmittal not required. This subject matter is covered by a license already granted or the equivalent U.S. national application. Refer to that license for information concerning its scope.



License for foreign transmittal not required. 37 CFR 5.11(e)(1) or 37 CFR 5.11(e)(2). However, a license may be required for additional subject matter. See 37 CFR 5.15(h).



Foreign transmittal license granted. 35 U.S.C. 184; 37 CFR 5.11 on 25 Oct 2005

(date)



37 CFR 5.15(e)



37 CFR 5.15(h)

Name and mailing address of the receiving Office

Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 703-305-3230

Authorized officer

Eric Simms

Telephone No. 703-308-9290 EX 120

Form PCT/RO/105 (July 1992)

PATENT COOPERATION TREATY

177/169

From the RECEIVING OFFICE

PCT

INVITATION TO CORRECT PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 4.10, 26bis.1, 26bis.2(a) and (b))

To: STEVEN C. BRUESS MERCHANT & GOULD P.C. P.O. BOX 2903 MINNEAPOLIS, MINNESOTA 55402-0903	
Date of mailing (day/month/year)	22 NOV 2005
Applicant's or agent's file reference 11688.153	REPLY DUE See item 1
International application No. PCT/US2005/031844	International filing date (day/month/year) 08 Sep 2005
Applicant GENENTECH, INC.	

The applicant is hereby invited, within the time limit indicated below, to correct, by a notice submitted to this receiving Office, defects in the priority claim(s), as indicated in the Annex.

1. Time limit to respond to this invitation (Rule 26bis.1(a)):

- within 16 months from the (earliest) priority date, or
 - if the (earliest) priority date is changed as a result of the correction or addition of the (earliest) priority claim, within 16 months from that (earliest) priority date so changed,
- whichever expires first, provided that such a notice may, in any event, be submitted until the expiration of four months from the international filing date.

Failure to respond to this invitation within the prescribed time limit may result in the priority claim concerned to be considered, for the purposes of the procedure under the PCT, not to have been made (Rule 26bis.2(b)).

2. In the case where multiple priorities have been claimed, this invitation relates to the following priority claim(s):

3. A copy of this invitation is being sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 703-305-1230	Authorized officer Eric Simms Telephone No. 703-308-9290 EX 120
---	---

Form PCT/RO/110 (July 1998; reprint January 2004)

This receiving Office has found the following defects in the priority claim(s):

1. Failure to Comply with the Requirements of Rule 4.10

a. ☒ National application

- ☐ Missing indication of the filing date of the earlier application.
- ☒ Filing date indicated for the earlier application does not fall within the period of 12 months preceding the international filing date.
- ☒ Missing indication of the number of the earlier application.*
- ☐ Missing indication of the country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, or of the Member of the World Trade Organization that is not party to that Convention, in which the earlier national application was filed.
- ☐ The country indicated is neither a party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property nor a Member of the World Trade Organization.

b. ☐ Regional application

- ☐ Missing indication of the filing date of the earlier application.
- ☐ Filing date indicated for the earlier application does not fall within the period of 12 months preceding the international filing date.
- ☐ Missing indication of the number of the earlier application.*
- ☐ Missing indication of the authority entrusted with the granting of regional patents under the applicable regional patent treaty.
- ☐ The authority indicated as the authority entrusted with the granting of regional patents does not grant regional patents.
- ☐ The priority claim in relation to the ARIPO application does not indicate either at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, or at least one Member of the World Trade Organization, for which the earlier application was filed.

c. ☐ International application

- ☐ Missing indication of the filing date of the earlier application.
- ☐ Filing date indicated for the earlier application does not fall within the period of 12 months preceding the international filing date.
- ☐ Missing indication of the number of the earlier application.*
- ☐ Missing indication of the receiving Office with which it was filed.

2. Inconsistency with the Corresponding Indications in the Priority Document*

a. ☐ Inconsistency with regard to the filing date of the earlier application:

The request indicates:

The priority document indicates:

b. ☐ Inconsistency with regard to the number of the earlier application:

The request indicates:

The priority document indicates:

c. ☐ Inconsistency with regard to the country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or the Member of the World Trade Organization in which the national application was filed:

The request indicates:

The priority document indicates:

d. ☐ Inconsistency with regard to the authority entrusted with the granting of regional patents under the applicable regional patent treaty:

The request indicates:

The priority document indicates:

e. ☐ Inconsistency with regard to the receiving Office with which the international application was filed:

The request indicates:

The priority document indicates:

* Even if this defect is not corrected in response to this invitation, the priority claim concerned will not be considered not to have been made (Rule 26bis.2(b)).

Docket No. PR1980

ASSIGNMENT

WHEREAS, Charles Matthew Winter, a citizen of the United States, residing at 2433 Coronet Blvd., Belmont, California, 94002 (hereinafter "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

PROCESS FOR CONCENTRATION OF ANTIBODIES AND THERAPEUTIC PRODUCTS THEREOF

for which a provisional application Serial No. 60/609,092, (Docket No. PR1980) has been filed by him on September 9, 2004; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, and NOVARTIS AG, a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the country of Switzerland, having a place of business at Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland, are desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern:

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR has and does hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, and unto the said NOVARTIS AG, and its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., and said NOVARTIS AG in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with GENENTECH, INC., and NOVARTIS AG to enable said GENENTECH, INC. and said NOVARTIS AG to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC. and said NOVARTIS AG (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC. and said NOVARTIS AG.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and said NOVARTIS AG, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that has not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

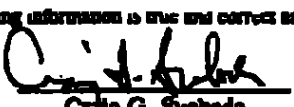
IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows:

South San Francisco

Dated: 1/24/05


Charles M. Winter

172

RECORDATION FORM COVER SHEET PATENTS ONLY		U S DEPARTMENT OF COMMERCE Patent and Trademark Office Any Dkt No. FR1980
Assistant Commissioner of Patents Please record the attached original documents or copy thereof		
1. Name of conveying party(ies): Charles M. Wimer Additional map(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No	2. Name and address of receiving party(ies): Name: <u>GENENTECH, INC.</u> Internal Address: Street Address: <u>1 DNA Way</u> City: <u>South San Francisco</u> State: <u>California</u> ZIP: <u>94080-4990</u> Additional map(s) & address(es) attached? ☒ Yes ☐ No <u>NOVARTIS AG</u> <u>Lichstrasse 35</u> <u>CH-4056</u> <u>Basel Switzerland</u>	
3. Nature of conveyance: ☒ Assignment Security Agreement Change of Name Other: Execution Date: <u>January 24, 2005</u>	<u>Merger</u>	
4. Application number(s) or patent number(s): If this document is being filed together with a new application, the expiration date of the application is A. Patent Application No.(s) <u>60/609,092</u> B. Patent No.(s) Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No		
5. Name and address of party to whom correspondence concerning documents should be mailed: Craig G. Svoboda GENENTECH, INC. 1 DNA Way South San Francisco, CA 94080	6. Total number of applications and patents involved: <u>1</u> 7. Total fee (37 CFR 3.41): \$ <u>40.00</u> - Enclosed ☒ Authorized to be charged to deposit account 8. Deposit account number: <u>07-0630</u>	
DO NOT USE THIS SPACE		
9. Signature and signature: To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and my attached copy is a true copy of the original documents. Name of Person Signing Registration No.  Craig G. Svoboda 39,044 January 24, 2005 Date Total number of pages comprising cover sheet, attachments and document: <u>3</u> Revised (10/1/95)		

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 11669.153WOU1

Box No. I TITLE OF INVENTION

PROCESS FOR CONCENTRATION OF ANTIBODIES AND THERAPEUTIC PRODUCTS THEREOF

Box No. II APPLICANT

☐ This person is also inventor

Name and address: (Family names followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

GENENTECH, INC.
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990
United States of America

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's Registration No. with Office

State (that is, country) of nationality:
US

State (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family names followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

NOVARTIS, AG
Lichtstrasse 35
Basel CH-4056
Switzerland

This person is:

☒ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No with Office

State (that is, country) of nationality:
CH

State (that is, country) of residence:
CH

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family names followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

BRUESS, Steven C.
Merchant & Gould P.C.
P.O. Box 2903
Minneapolis, Minnesota 55402-0903
United States of America

Telephone No.
612/ 336-4711

Facsimile No.
(612) 336-4751

Teleprinter No.

Agent's Registration No. with Office
34,130

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III		FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.</i>			
Name and address (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) WINTER, Charles Matthew 2433 Coronet Blvd. Belmont, California 94002 United States of America	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with Office		
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US		
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with Office		
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:		
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with Office		
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:		
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with Office		
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:		
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box			
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.			

174

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

- ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection
- ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection
- ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which the priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in those and certain of States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
Item (1) 09 September 2004 09.09.2004	60/609,092	US		
Item (2) 06 September 2005 06.09.2005	Unknown	US		
Item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☒ all items ☐ Item (1) ☐ Item (2) ☐ Item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)).

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)

(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / EP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year): Number: Country (or regional Office):

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

- | | | |
|---|---|---|
| ☐ Box No. VIII (i) | Declaration as to identity of the inventor | : |
| ☐ Box No. VIII (ii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as to the international filing date, to file and be granted a patent | : |
| ☐ Box No. VIII (iii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as to the international filing date, to the priority of the earlier application. | : |
| ☐ Box No. VIII (iv) | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designations of the United States of America) | : |
| ☐ Box No. VIII (v) | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty | : |

Form PCT/RO/101 (last sheet) (January 2004)

See Notes to the request form

176

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF: <u> LING </u>		Number of items																																		
This international application contains: (a) In paper form, the following number of sheets: request (including declaration sheets) : 4 description (excluding sequence listing and/or tables related thereto) : 47 claims : 5 abstract : 1 drawings : 17 Sub-total number of sheets : 74 sequence listing : : tables related thereto : : <i>(For both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)</i> Total number of sheets : 74 (b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto (c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the ☐ sequence listing: ☐ tables related thereto: <i>(Additional copies to be indicated under items 9(ii) and for 10(ii), in right column)</i>																																				
This international application is accompanied by the item(s) marked below: <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 80%;">1. ☒ fee calculation sheet</td> <td style="width: 20%; text-align: right;">1</td> </tr> <tr> <td>2. ☐ original separate power of attorney</td> <td style="text-align: right;">0</td> </tr> <tr> <td>3. ☐ original general power of attorney</td> <td style="text-align: right;">0</td> </tr> <tr> <td>4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:</td> <td style="text-align: right;">0</td> </tr> <tr> <td>5. ☐ statement explaining lack of signature</td> <td></td> </tr> <tr> <td>6. ☐ priority document(s) identified in Box No VI as item(s):</td> <td></td> </tr> <tr> <td>7. ☐ translation of international application into (language):</td> <td></td> </tr> <tr> <td>8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material</td> <td></td> </tr> <tr> <td>9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)</td> </tr> <tr> <td colspan="2">(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter</td> </tr> <tr> <td colspan="2">(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column</td> </tr> <tr> <td>10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)</td> </tr> <tr> <td colspan="2">(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)</td> </tr> <tr> <td colspan="2">(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column</td> </tr> <tr> <td colspan="2">11. ☒ Other (specify): <u>Gen. Transmittal (in dupl) Check in the amount of \$4198, Return Postcard.</u></td> </tr> </table>			1. ☒ fee calculation sheet	1	2. ☐ original separate power of attorney	0	3. ☐ original general power of attorney	0	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	0	5. ☐ statement explaining lack of signature		6. ☐ priority document(s) identified in Box No VI as item(s):		7. ☐ translation of international application into (language):		8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material		9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)		(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column		10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)		(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column		11. ☒ Other (specify): <u>Gen. Transmittal (in dupl) Check in the amount of \$4198, Return Postcard.</u>	
1. ☒ fee calculation sheet	1																																			
2. ☐ original separate power of attorney	0																																			
3. ☐ original general power of attorney	0																																			
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	0																																			
5. ☐ statement explaining lack of signature																																				
6. ☐ priority document(s) identified in Box No VI as item(s):																																				
7. ☐ translation of international application into (language):																																				
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material																																				
9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)																																				
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)																																				
(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter																																				
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column																																				
10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)																																				
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)																																				
(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)																																				
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column																																				
11. ☒ Other (specify): <u>Gen. Transmittal (in dupl) Check in the amount of \$4198, Return Postcard.</u>																																				
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 0 Language of filing of the international application: English																																				
Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE <i>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</i> By <u>Steven C. Bruns</u> <u>CPM</u>																																				

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application: 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received: 6. Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

12

13:47708
177

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

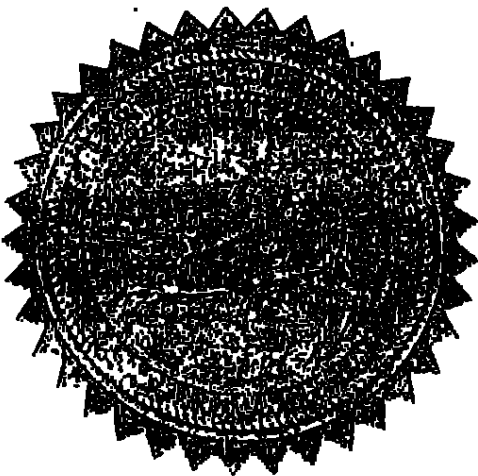
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

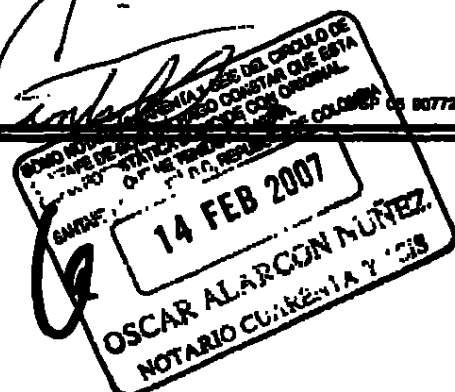


[Signature]

Secretary of State

NP-24 A (REV. 4-05)

BY



CALIF RNIA ALL-PURPOSE A KNOWLEDGMENT

288 178

State of California

County of

San Mateo

ss.

On December 6, 2005

before me,

Aida Mielat Guian

Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared

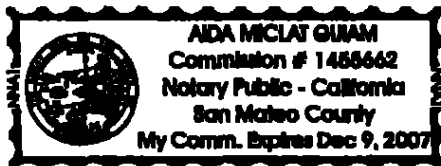
Timothy R. Schwartz

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

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



WITNESS my hand and official seal.

Aida Mielat Guian
Signature of Notary Public

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____

Number of Pages: _____

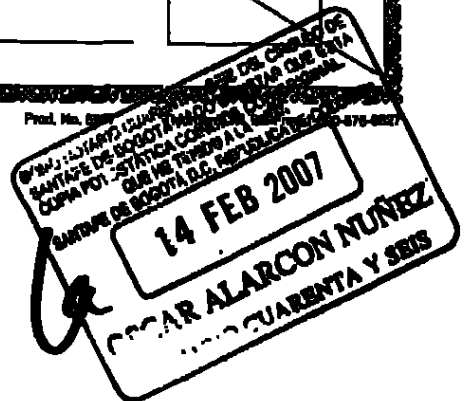
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

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

Signer is Representing: _____



Brigard & Castro
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 la tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

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

El 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. 18-56 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 2003

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 vegetable varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

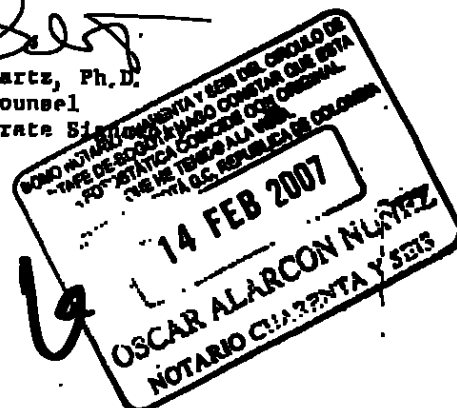
To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting;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

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, 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. 18-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in South San Francisco, California
USA

this 6th day of December 2005

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



AUTHORIZATION

~~143~~ 180

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



~~181~~ 181

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

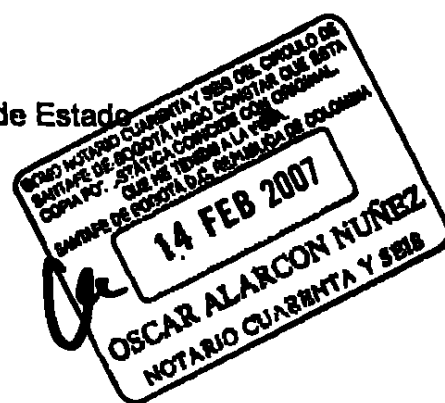
CERTIFICADO

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



182

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
COMISION # 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 reedición fraudulenta de este forma o otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

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

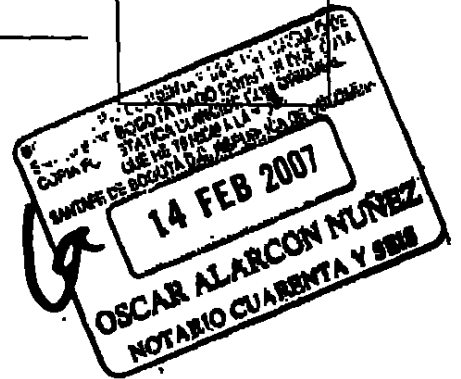
Capacidad(es) Relivindicada(s) por el (los) firmante(s)

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
Para ella del dedo aquí



AUTORIZACION

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

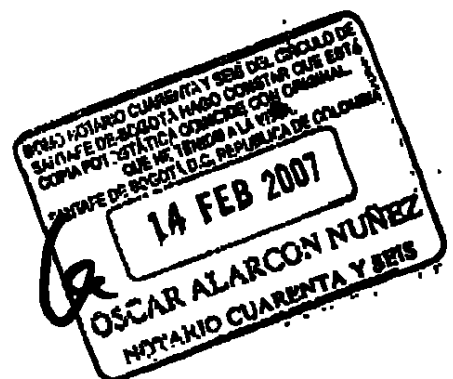
27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.



97.200
184
1/4

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

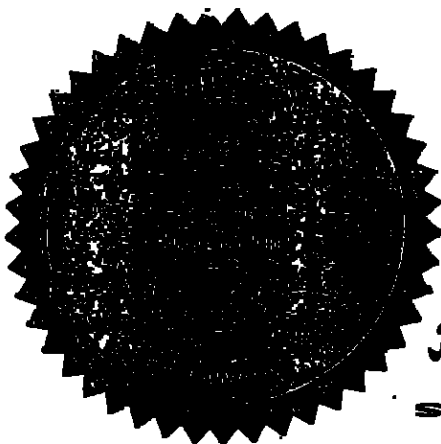
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

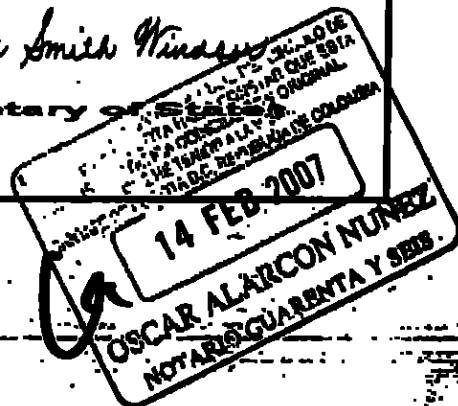
8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

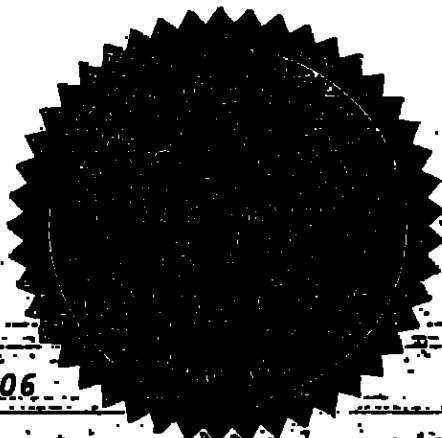


Delaware

PAGE 1

The First State

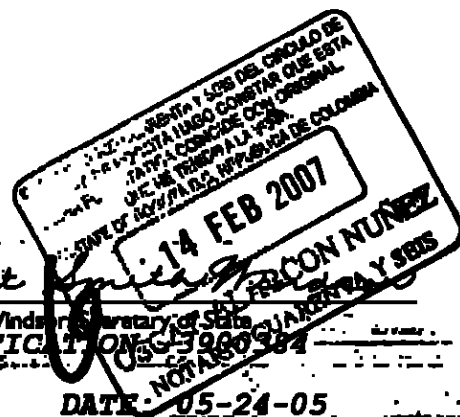
I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION



2112549

050426506

DATE: 05-24-05

186

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

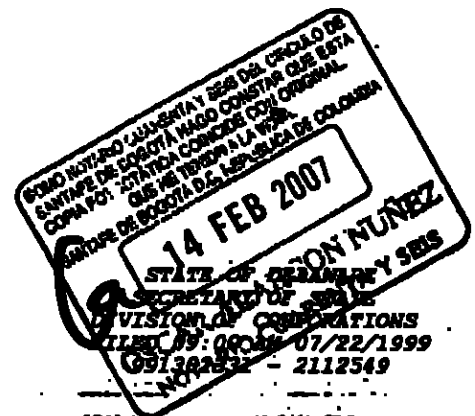
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

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").



1027/187

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.

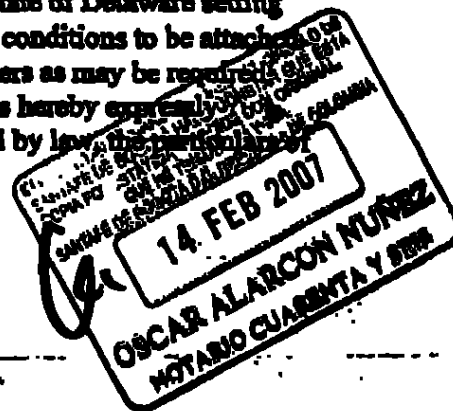
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the 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 by law and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law.



102/188

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.



~~188~~ 189

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.

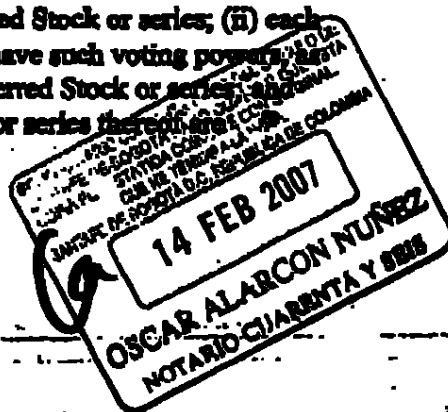
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(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; (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof shall be entitled to elect directors, the provisions of such Preferred Stock or series shall be deemed to be amended to the extent necessary to give effect to the provisions of this section.



~~258~~ 190

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.

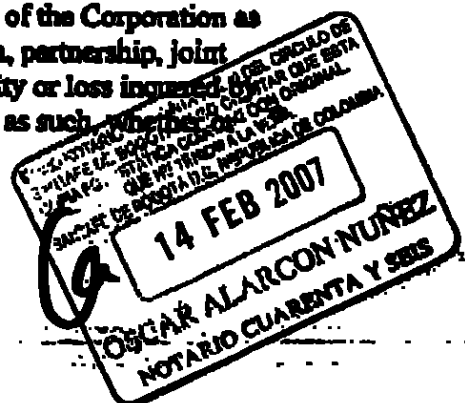
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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.



20 191

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.

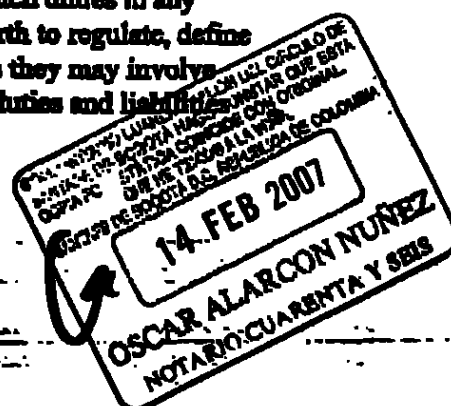
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect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

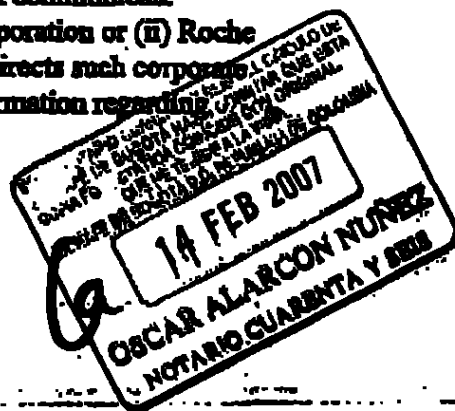
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(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.



193

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.

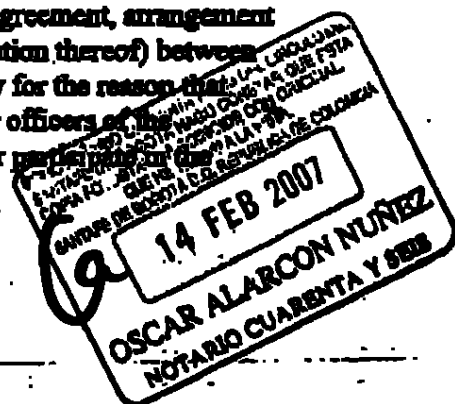
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or 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



20/ 194

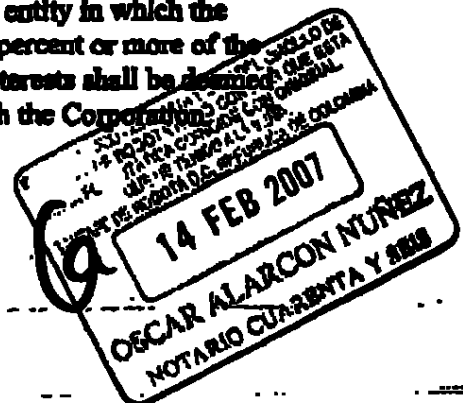
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, 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.

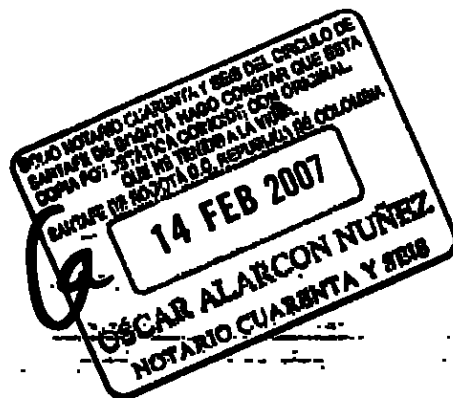
SECTION 9.05. Contracts Covered. For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more 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.



195

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.

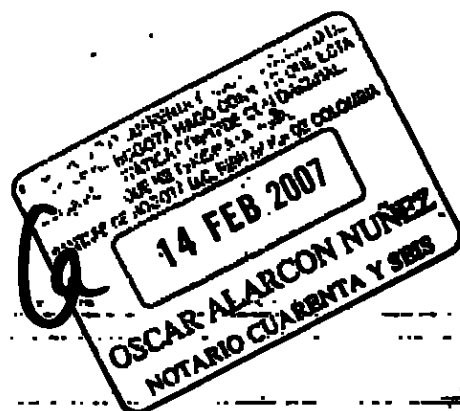


286 196

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



APOSTILLA

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

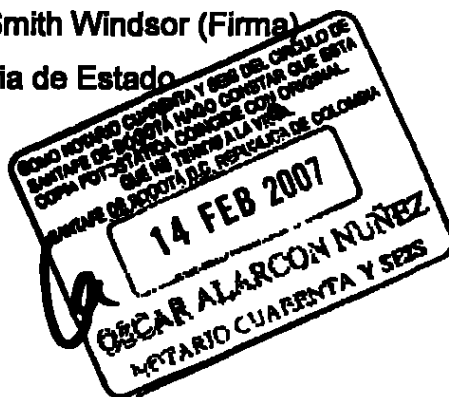
1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

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



198

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

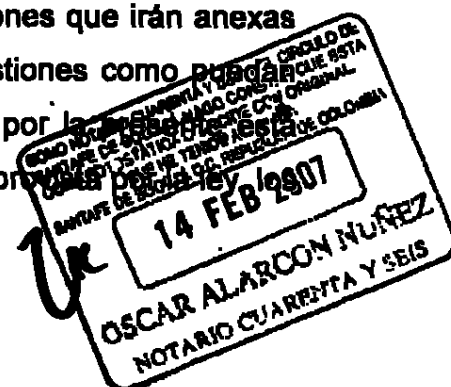
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de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

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

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

SECCIÓN 4.03. Acción Preferencial

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



199

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

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

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

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

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

ARTICULO 3

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

ARTICULO 4

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



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

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

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

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

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

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

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

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en

liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la



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 Preferencial. Durante cualquier periodo cuando los accionistas



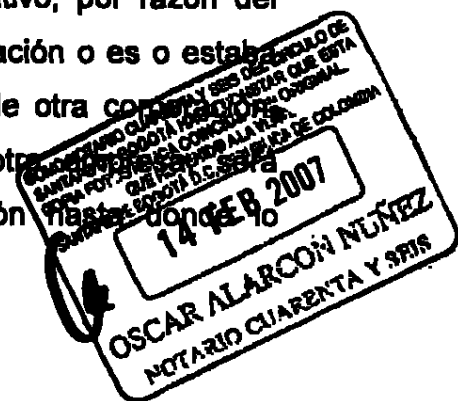
~~202~~ 202

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

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

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

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



203
permítala la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión con cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

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

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

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

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

ARTICULO 7

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



ARTICULO 8

204

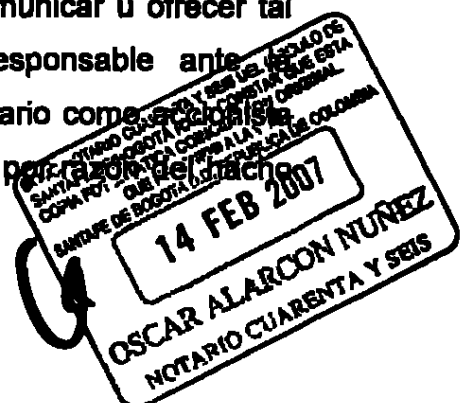
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define 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 de tal transacción.



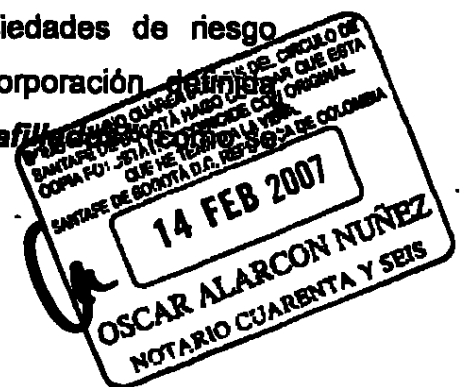
205

que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para sí 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 sea si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para sí 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 de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "afiliadas" de la Corporación.



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 Sección 8.05.



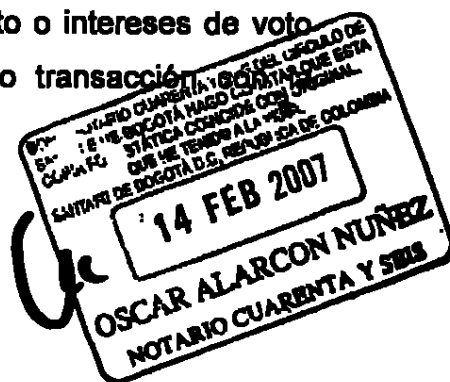
207

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 Corporación.



208

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, pu da 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.

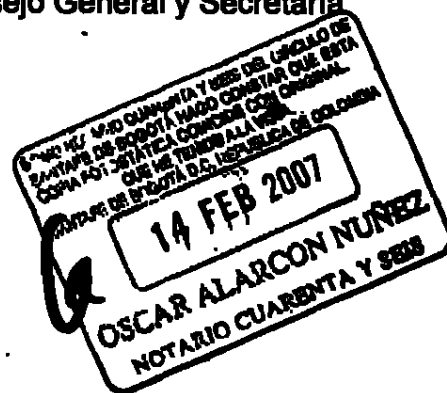
GENENTECH, INC.

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

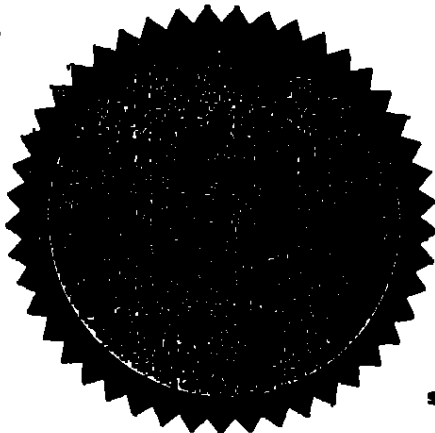
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

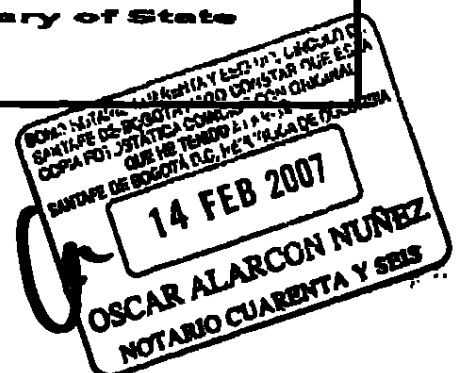
8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



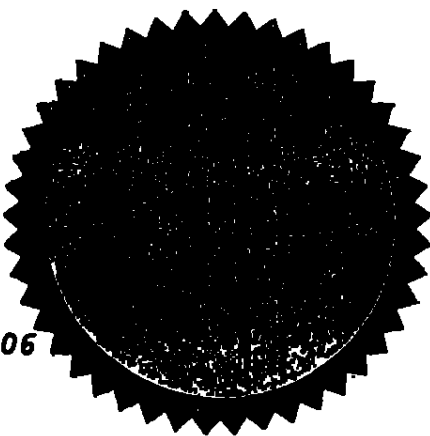
Delaware

PAGE 1

210

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.



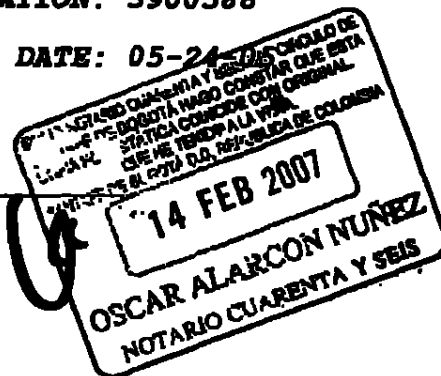
2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-2007



dy Miller
~~22~~ 211-

DOES HEREBY CERTIFY:

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:

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.

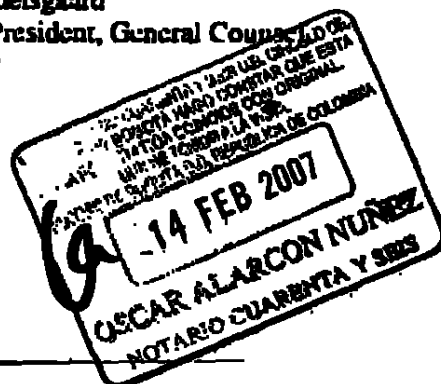
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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

14747



APOSTILLA

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

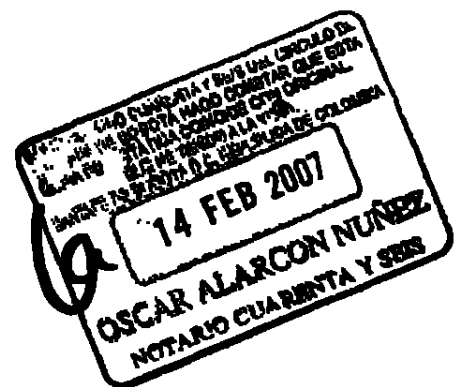
1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)

Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

27
213

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.

NOTARIO PUBLICO Y ABOGADO EN LA REPUBLICA DE COLOMBIA
CALLE 100 DE BOGOTÁ HAYO CONSTAR QUE ESTA
COPIA ES VERDADERA Y CORRECTA
CALLE 100 DE BOGOTÁ HAYO CONSTAR QUE ESTA
COPIA ES VERDADERA Y CORRECTA
CALLE 100 DE BOGOTÁ HAYO CONSTAR QUE ESTA
COPIA ES VERDADERA Y CORRECTA
14 FEB 2007
Harriet Smith Windsor (Don NUNEZ)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACION: 3800386
NOTARIO: 3800386
FECHA: 05 - 24 - 05

214

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 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 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.



215

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

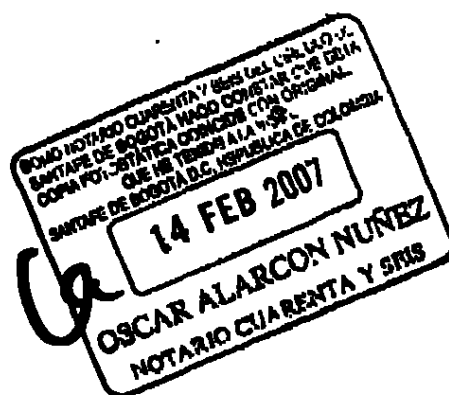
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

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

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

Certified

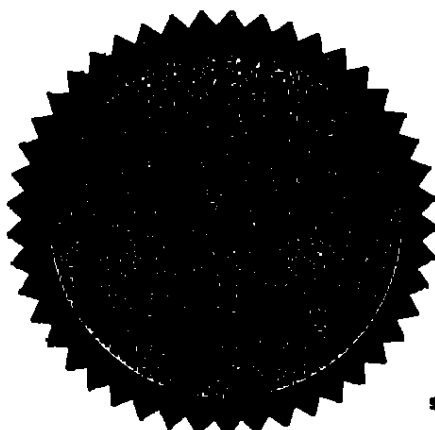
5. at Dover, Delaware

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

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

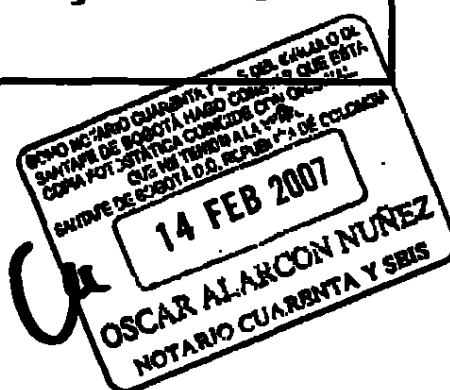
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

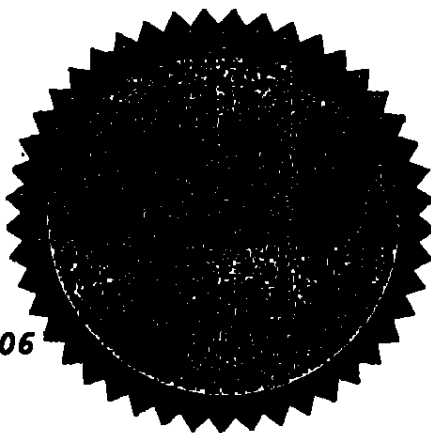


Delaware

~~2~~ 217
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.



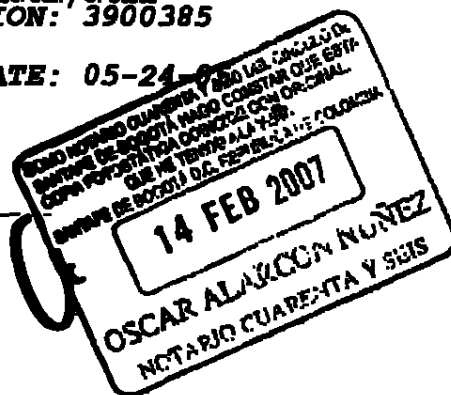
2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-00



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

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

DOES HEREBY CERTIFY:

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

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

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

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

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

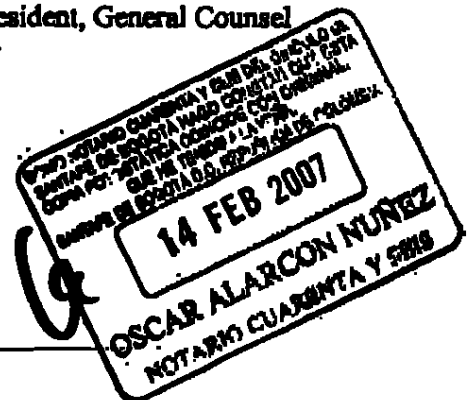
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

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

GENENTECH, INC.

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

75841



APOSTILLA

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

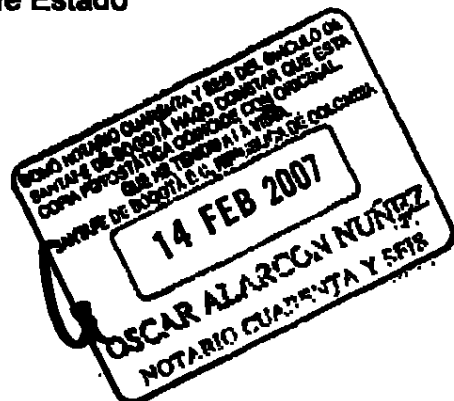
1. **Pais: Estados Unidos de América**
Este documento público
2. **ha sido firmado por Harriet Smith Windsor**
3. **actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware**
4. **lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado**

Certificado

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

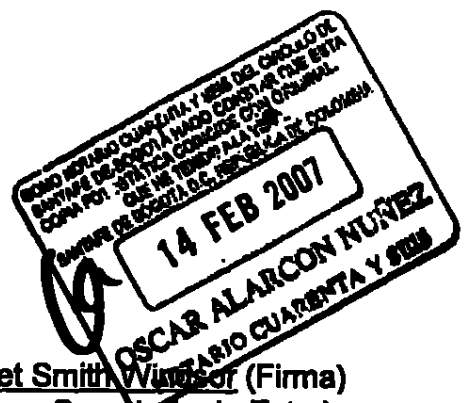
Harriet Smith Windsor (Firma)

Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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



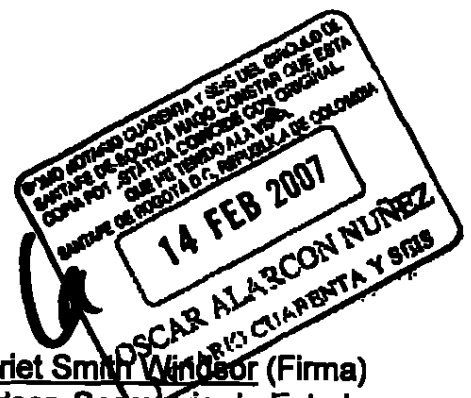
Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 - 24 - 05

23/ 21

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

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

Handwritten initials and number: 22

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

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

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

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

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

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



227 223

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.



Brigard & Castro

BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros) Navartis AG

domiciliado(a) en Lichstrasse 35, CH-4056 Basel, Suiza

Nombre(s) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO 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 recibir 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, marcas comerciales y enseñas, marcas comerciales, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtención 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) faculta(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 en la 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 desistír, transigir, comprometer, y la de suscribir en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(a) en la Carrera 7 No. 18-58 Piso 8, 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

(We) Navartis AG

domiciled in Lichstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland

Herby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO 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, slogans, emblems, slogans, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainment of vegetable varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

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

This power includes the faculty to ratify or confirm deed, 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 appoint JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 18-58, Piso 8, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

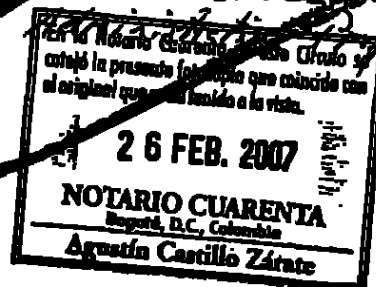
Granted and signed in

this 19th day of October 2005

Signature

Name

True



Attestation

I, the undersigned notary public in Basel, Switzerland, certify herewith that the above signatures are the genuine signatures of **Mrs. June Violet Mentel**, citizen of Grenchen/SO, Switzerland, residing in Arlesheim, Switzerland, and **Mr. Reto Halbelsen**, citizen of Wahlen/BL, Switzerland, residing in Laufen, Switzerland, both acting for **Novartis AG**, in Basel, Switzerland, both as proxy holders, both with joint signature.

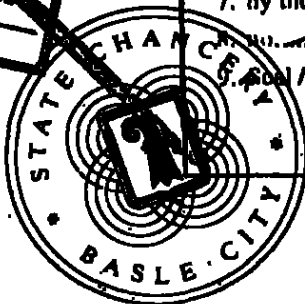
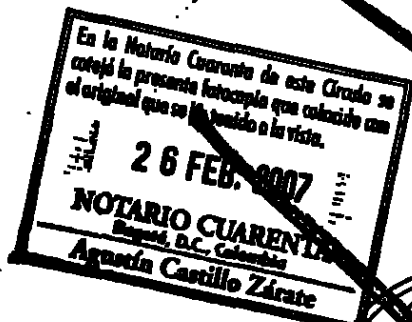
The authenticity of the signatures was established by comparison.

BASEL, this 24th (twenty-fourth) of October 2005 (twothousandandfive).



M. Staehelin, Notar

Leg.Prot.Nr.: 879 /2005



APOSTILLE	
(Hague Convention of October 5th, 1961)	
1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)	
This official document	
2. is signed by	<i>June Violet Mentel</i>
3. in his/her function as	<i>Reto Halbelsen</i>
4. and certified by the seal of the	<i>Matthias Staehelin</i>
Certified 25. Okt. 2005	
5. in Basel, Switzerland	6. on
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
8. No. 10.036/17'02f	
9. Seal / Stamp:	10. Signature: <i>Heidi Fischer</i>
	Heidi Fischer

Handelsregister des Kantons Basel-Stadt Hauptregister

Firmennummer	Rechtsnatur	Eintragung	Löschung	Uebersetzung von:	1
CH-270.3.002.061-2	Aktiengesellschaft	01.03.1996		auf:	

Alle Eintragungen

Ei	Lö	Firma	Ref	Stz
1		Novartis AG	1	Basel
1	2	(Novartis SA) (Novartis Ltd)		
2		(Novartis SA) (Novartis Inc.)		

Ref	Aktienkapital (CHF)	Liberierung (CHF)	Aktien-Stückelung	Ref	Adresse der Firma
1	100'000.--	100'000.--	5'000 Namenaktien zu CHF 20.--	1	c/o Dürr Wüstener Partner
5	1'442'602'340.--	1'442'602'340.--	64'058'249 Namenaktien zu CHF 20.-- und 8'071'860 Inhaberaktien zu CHF 20.--		Genèvebühlstr. 7
7			72'130'117 Namenaktien zu CHF 20.--	5	Schwarzwaldallee 215
14			2'885'204'680 Namenaktien zu CHF 20.--		4058 Basel
20	1'412'075'000.--	1'412'075'000.--	2'824'150'000 Namenaktien zu CHF 20.--	10	Lichtstr. 35
23	1'400'735'000.--	1'400'735'000.--	2'801'470'000 Namenaktien zu CHF 20.--		4056 Basel
29	1'388'605'000.--	1'388'605'000.--	2'777'210'000 Namenaktien zu CHF 20.--		
Ref	PS-Kapital (CHF)	Liberierung (CHF)	Partizipationscheine		

Ei	Lö	Zweck	Ref
1	2	Beteiligung an Unternehmen, die insbesondere auf dem Gebiet des Kunsthandels tätig sind. Die Gesellschaft ist berechtigt, Liegenschaften und Immaterialgüterrechte zu erwerben, zu verwerten und zu verkaufen.	
2	12	Beteiligung an Unternehmen, die insbesondere auf dem Gebiet der Gesundheit, der Agrarwirtschaft, der Ernährung, der Spezialitätenchemie, der Physik oder auf verwandten Gebieten tätig sind. Die Gesellschaft kann Liegenschaften und Immaterialgüterrechte erwerben, verwerten und verkaufen.	
12		Beteiligung an Unternehmen, die auf dem Gebiet der Gesundheit oder Ernährung tätig sind. Die Gesellschaft kann sich auch an Unternehmen der Biologie, Chemie, Physik, Informatik oder verwandter Gebiete beteiligen. Sie ist berechtigt, Liegenschaften und Immaterialgüterrechte zu erwerben, zu verwerten und zu verkaufen.	

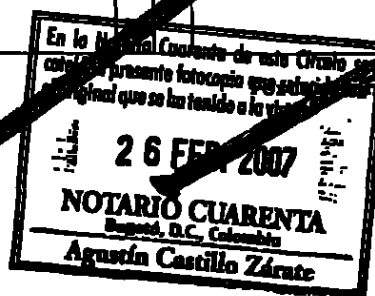


Ei	Lö	Bemerkungen	Ref	Statutendatum
1	2	Mitteilungen an die Aktionäre. Brieflich, oder nach Ermessen des Verwaltungsrates durch eingeschriebenen Brief.	1	29.02.1996
2		Vinkulierung: Die Übertragbarkeit der Namenaktien ist nach Massgabe der Statuten beschränkt.	2	05.03.1996
20		Rückzahlung von 61'054'680 Namenaktien zu CHF --.50. Beachtung der gesetzlichen Vorschriften gemäss Art. 734 OR durch öffentliche Urkunde vom 20.06.2002 festgestellt.	5	15.10.1996
23		Vernichtung von 22'680'000 eigenen Namenaktien zu CHF --.50. Beachtung der gesetzlichen Vorschriften gemäss Art. 734 OR durch öffentliche Urkunde vom 26.05.2003 festgestellt.	7	21.04.1999
29		Vernichtung von 24'260'000 eigenen Namenaktien zu CHF --.50. Beachtung der gesetzlichen Vorschriften gemäss Art. 734 OR durch öffentliche Urkunde vom 14.05.2004 festgestellt.	12	11.10.2000
			14	22.03.2001
			20	21.03.2002
			23	04.03.2003
			29	24.02.2004

Ei	Lö	Sacheinlagen, Sachübernahmen, besondere Vorteile, Genussscheine	Ref	Publikationsorgan
5		Fusion: Die Gesellschaft übernimmt im Zusammenhang mit der Kapitalerhöhung vom 15.10.1996 Aktiven von CHF 10'080'626'229.-- und Passiven von CHF 4'380'126'622.-- der "CIBA-GEIGY AG", in Basel, sowie Aktiven von CHF 4'383'629'774.-- und Passiven von CHF 451'390'590.-- der "Sandoz AG", in Basel, gemäss Fusionsvertrag vom 06.03.1996 und Fusionsbilanzen per 31.12.1995 zum Preis von insgesamt CHF 9'632'738'791.--, wovon CHF 1'442'502'340.-- an das Aktienkapital angerechnet werden und wofür die Aktionäre der "CIBA-GEIGY AG" 27'313'989 Namenaktien zu CHF 20.-- und 3'994'848 Inhaberaktien zu CHF 20.-- erhalten und die Aktionäre der "Sandoz AG" 36'739'260 Namenaktien zu CHF 20.-- und 4'077'000 Inhaberaktien zu CHF 20.-- erhalten.	1	SHAB

Ei	Lö	Zweigniederlassung	Ei	Lö	Zweigniederlassung	Ei	Lö	Zweigniederlassung	Ei	Lö	Zweigniederlassung

Basel, 11.02.2005 10:16



auf der folgenden Seite 2



Handelsregister des Kantons Basel-Stadt Hauptregister

CM-270.3.002.061-2

Novartis AG

Basel

2

Alle Eintragungen

Zeil	Ref	TS-Nr	TS-Datum	SHAB	SHAB-Datum	Seite	Zeil	Ref	TS-Nr	TS-Datum	SHAB	SHAB-Datum	Seite
SE	1	1113	01.03.1996	50	12.03.1996	1422	BR	18	2618	24.05.2002	103	31.05.2002	6
TH	2	1214	07.03.1996	55	19.03.1996	1564	BR	19	2722	31.05.2002	108	07.06.2002	6
PN	3	1904	19.04.1996	84	01.05.1996	2487	KU	20	3448	08.07.2002	132	11.07.2002	5
PN	4	3182	05.07.1996	140	22.07.1996	4386	SB	21	5155	02.10.2002	195	09.10.2002	5
TH	5	6560	20.12.1996	6	13.01.1997	183	SB	22	6366	05.12.2002	241	12.12.2002	5
BC	6	1381	11.03.1997	57	25.03.1997	2021	KU	23	3614	18.06.2003	118	24.06.2003	6
TH	7	1868	27.04.1999	85	04.05.1999	2920	BR	24	5979	20.10.2003	206	27.10.2003	6
ME	8	5418	29.11.1999	237	06.12.1999	8242	SE	25	6914	03.12.2003	238	10.12.2003	6
ME	9	5717	14.12.1999	248	21.12.1999	8638	SB	26	912	16.02.2004	36	23.02.2004	5
ME	10	2773	09.06.2000	117	19.06.2000	4115	SE	27	1799	02.04.2004	70	13.04.2004	5
JO	11	5085	24.10.2000	212	31.10.2000	7405	SU	28	1894	08.04.2004	74	19.04.2004	6
SB	12	5501	15.11.2000	228	22.11.2000	7932	KU	29	2707	02.06.2004	108	08.06.2004	6
EB	13	536	25.01.2001	22	01.02.2001	789	FE	30	2849	08.06.2004	112	14.06.2004	6
TH	14	2512	07.05.2001	90	10.05.2001	3527	SB	31	5214	01.10.2004	195	07.10.2004	5
SC	15	2730	16.05.2001	99	23.05.2001	3890	SB	32	6199	19.11.2004	230	25.11.2004	5
SB	16	576	28.01.2002	23	04.02.2002	6							
SE	17	1015	22.02.2002	42	01.03.2002	6							

El	As	L5	Personalangaben	Funktion	Zeichnungsart
1		2m	Wetter, Dr. Rolf, von Surzach und Erlen, in Thalwil	Mitglied des Verwaltungsrates	Einzelunterschrift
1		3	Frouhandbire Peter-Eisels, in Marthalen	Revisionsstelle	
2		7	Krauer, Dr. Alex, von Basel, in Riehen	Präsident und Delegierter des Verwaltungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien
2			Rudloff, Hans-Jörg, deutscher Staatsangehöriger, in Hermance	Vizepräsident des Verwaltungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien
2		8m	Sihler, Prof. Dr. Helmut, österreichisches Staatsangehöriger, in Pörschach am Wörthersee (A)	Vizepräsident des Verwaltungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien
2		7m	Vacella, Dr. Daniel L., von Peschiavo, in Binningen	Delegierter des Verwaltungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien
2		5	Wetter, Dr. Rolf, von Surzach und Erlen, in Thalwil	Mitglied des Verwaltungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien
2		10m	Bäcker, Dr. Urs, von Thal, in Bern		Kollektivunterschrift zu zweien
2		5	Batzer, Dr. Martin, von Alesheim, in Binningen		Kollektivunterschrift zu zweien
2		10m	Brau, Dr. Raymond, von Oberegg, in Binningen		Kollektivunterschrift zu zweien
2			Manser, John, von Appenzell, in Riehen		Kollektivunterschrift zu zweien
2		5	Meyer, Rolf A., von Wahlen AG, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
2		5	Müller, Dr. Hans-Ulrich, von Winterthur, in Rietzstetten		Kollektivunterschrift zu zweien
2		8	Oppikofer, Dr. Ulrich, von Bern und Giesgenhausen, in Seitzberg		Kollektivunterschrift zu zweien
2		5	Ruppel, Peter, von Basel, in Aesch-BL		Kollektivunterschrift zu zweien
2		5	Sidler, Dr. Peter, von Luserne, in Allschwil		Kollektivunterschrift zu zweien
2			Vierkötter, Jürgen, deutscher Staatsangehöriger, in Bärteben		Kollektivunterschrift zu zweien
3		4m	Schweizerische Frouhandgesellschaft Coopere & Lybrand AG, in Basel		
4		9	STC Coopere & Lybrand AG, in Basel		
5		8	Arigoni, Prof. Dr. Dulio, von Lugano, in Zürich		ohne Zeichnungsbe-
5		8m	Breuel, Birgit, deutsche Staatsangehörige, in Berlin (D)		rechtigung
5			Burckhardt, Prof. Dr. Peter, von Basel, in Pully		ohne Zeichnungsbe-
5					rechtigung
5		8	Cassani, Dr. Kaspar V., von Büschwil und Bolligen, in Uster		ohne Zeichnungsbe-
5		18	Deerig, Dr. Hans-Ulrich, von Appenzell, in Sumikon		rechtigung
5		27	Frehner, Walter G., von Herisau, in Riehen		ohne Zeichnungsbe-
5		10	Gentiliand, Robert L., von Ormont-Dessus, in Gilly		rechtigung
5			Landolt, Pierre, von Aarau, in La Tour-de-Peilz		ohne Zeichnungsbe-
5		8m	Lippuner, Heinz, von Grabs, in Oberwil BL		rechtigung
5		8	Rutten, Prof. Dr. William J., Bürger der USA, in San Francisco (USA)		ohne Zeichnungsbe-
					rechtigung

Basel, 11.02.2005 10:16

Fortsetzung auf der folgenden Seite 3

Handelsregister des Kantons Basel-Stadt Hauptregister

N-270.3.002.061-2

Novartis AG

Basel

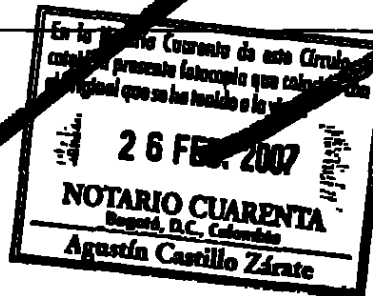
3

Alle Eintragungen

Ei	Äe	LO	Personalangaben	Funktion	Zeichnungsart
5		10	Wander, Dr. Jean, von Bern, in Muri b. Bern	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsbe- rechtigung
5		8m	Jensen, Alexandre, von Basel und Lengnau AG, in Zug	Mitglied des Ver- waltungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien, nicht als Verwaltungsrat
5			Duplain, Dr. Ingrid, von Basel, in Hofstetten SO	Sekretärin (nicht Mitglied)	Kollektivunterschrift zu zweien
5		23	Becker, Dr. Konrad, von Basel, in Bettingen		Kollektivunterschrift zu zweien
5		24	Bedmer, Shella, von Wald SN, in Reinach BL		Kollektivunterschrift zu zweien
5		8	Bradley, Dr. Claude Clenden, Bürger des USA, in Alpharetta (Georgia-USA)		Kollektivunterschrift zu zweien
5		8	Douaso, Pierre, französischer Staatsangehöriger, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
5		15	Eberle, Louis, von Märsiedeln und Zürich, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
5			Grubb, Dr. Philip, britischer Staatsangehöriger, in Inslingen (D)		Kollektivunterschrift zu zweien
5		21	Gürtler, Hans Beat, von Basel, in Lupsingen		Kollektivunterschrift zu zweien
5		13	Hammann, Dr. Heinz, deutscher Staatsangehöriger, in Möhlin		Kollektivunterschrift zu zweien
5		23	Haring, Dr. Werner, deutscher Staatsangehöriger, in Lörrach (D)		Kollektivunterschrift zu zweien
5			Heitz, Peter, von Basel, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
5		24	Heerich, Dr. Martin, von Basel, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
5		13	Inhof, Heinz P., von Freienwil, in Riehen		Kollektivunterschrift zu zweien
5		8	Jeannot, Roland, von Travers, in Genève		Kollektivunterschrift zu zweien
5			Kaufmann, Dr. Max, von Zürich, in Riehen		Kollektivunterschrift zu zweien
5		13	Kändler, Dr. Hans, von Bolligen, in Sissach		Kollektivunterschrift zu zweien
5			L'Eplattenier, Dr. François, von Les Geneveys-sur-Coffrane, in Hofstetten SO		Kollektivunterschrift zu zweien
5		13	Mäder, Christoph, von Zürich, in Bettingen		Kollektivunterschrift zu zweien
5			Morris, Clive, britischer Staatsangehöriger, in Riehen		Kollektivunterschrift zu zweien
5			Mostosi, Heinz, von Basel, in Hofstetten SO		Kollektivunterschrift zu zweien
5		8	Pyett, David E.I., britischer Staatsangehöriger, in Bettingen		Kollektivunterschrift zu zweien
5		6	Reichenstein, Katharina, von Pratteln, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
5		8	Sano, Dr. Wolfgang, von Riehen, in Riehen		Kollektivunterschrift zu zweien
5		13	Smolders, Walter, belgischer Staatsangehöriger, in Ettingen		Kollektivunterschrift zu zweien
5		8	Syfrig, Bruno, von Herz, in Muttens		Kollektivunterschrift zu zweien
5		30	Tabler, Dr. Peter, von Ettingen und Thal, in Ettingen		Kollektivunterschrift zu zweien
5		8	Wagnière, Daniel G., von Rueyres und Foy und Cologny, in Binningen		Kollektivunterschrift zu zweien
5		10	von Warburg, Prof. Dr. Walter P., von Hamburg, in Riehen		Kollektivunterschrift zu zweien
5		25	Yerke, Brian Alan, von Altstätten, in Binningen		Kollektivunterschrift zu zweien
6		10	Buehli, Anita, von Versam, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
6			Chestham, Malcolm B., britischer Staatsangehöriger, in Münchenstein		Kollektivunterschrift zu zweien
6			Eichhorn, Felix, von Basel, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
6			Lindenberger, Guido, von Fehren, in Emmetten		Kollektivunterschrift zu zweien
6		8	Mete, François, französischer Staatsangehöriger, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
7		8m	Vassella, Dr. Daniel L., von Peseziano, in Binningen	Präsident und Dele- gierter des Verwal- tungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien



Basel, 11.02.2005 10:16



Fortsetzung auf der folgenden Seite 4



Handelsregister des Kantons Basel-Stadt Hauptregister.

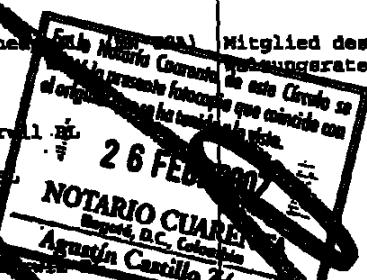
CH-270.3.002.061-2

Novartis AG

Basel

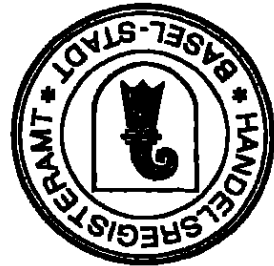
Alle Eintragungen

El	As	Lö	Personangaben	Funktion	Zeichnungsart
	8		Jetzer, Alexandre, von Basel und Lengnau AG, in Zug	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsbe- rechtigung
8		16m	George, William W., Bürger der USA, in Minneapolis (MN, USA)	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsbe- rechtigung
8			Zinkernagel, Prof. Dr. Rolf M., von Riehen, in Sumikon	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsbe- rechtigung
8			Sihler, Prof. Dr. Helmut, österreichischer Staatsangehöriger, in Pörschach am Wörthersee (A)	Visepäsident und Delegierter des Verwaltungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien
8			Vasella, Dr. Daniel L., von Poschiavo, in Risch	Präsident und Delegierter des Verwaltungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien
8		27	Lippuner, Heidi, von Grabs, in Oberwil BL	Mitglied des Verwaltungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien
8			Brauel, Birgit, deutsche Staatsangehörige, in Hannover (D)	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsbe- rechtigung
8		13	Atkins, Dr. John, britischer Staatsangehöriger, in Dietwil (S)		Kollektivunterschrift zu zweien
8			Brändli, Reto, von Zürich und Kriens, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
8			Ebeling, Thomas, deutscher Staatsangehöriger, in Muri bei Bern		Kollektivunterschrift zu zweien
8		15	Karabelas, Dr. Argeris Jerry, Bürger der USA, in Arlesheim		Kollektivunterschrift zu zweien
8		24	Walker, Norman, britischer Staatsangehöriger, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
8		13m	Wittwer, Reto, von Linden, in Zug		Kollektivunterschrift zu zweien
9			PricewaterhouseCoopers AG, in Basel	Revisionsstelle	
10			Bärlocher, Dr. Urs, von Thal, in Riehen		Kollektivunterschrift zu zweien
10			Breu, Dr. Raymond, von Oberagg, in Bottmingen		Kollektivunterschrift zu zweien
10		23	Meier, Horst J., deutscher Staatsangehöriger, in Riehen		Kollektivunterschrift zu zweien
10		18	Piengallini, Alfred genannt Al, Bürger der USA, in Jersey City (USA)		Kollektivunterschrift zu zweien
10			Schütz, Wolf Dietrich, deutscher Staatsangehöriger, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
10		30	Wissler, Dieter, deutscher Staatsangehöriger, in Blauen		Kollektivunterschrift zu zweien
11			Miller, George L., Bürger der USA, in Oberwil BL		Kollektivunterschrift zu zweien
13		31	Bellier, Helmut, von Gossau SZ, in Riehen		Kollektivunterschrift zu zweien
13			Diets, Dr. Jörg, deutscher Staatsangehöriger, in Allschwil		Kollektivunterschrift zu zweien
13			Rupprecht, Peter, von Basel, in Aesch BL		Kollektivunterschrift zu zweien
13		19	Wenzel, Dr. Gilbert, deutscher Staatsangehöriger, in Küssnacht SZ		Kollektivunterschrift zu zweien
13		23	Wittwer, Reto, von Linden, in Dietwil		Kollektivunterschrift zu zweien
15		22	Bürgin, Nils, von Basel, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
16			George, William W., Bürger der USA, in Minneapolis (MN, USA)	Mitglied des Verwaltungsrates	Kollektivunterschrift zu zweien
16		25	Frey, Johannes, von Stäfa, in Basel		Kollektivunterschrift zu zweien
16			Höin, Kurt, von Kaisten und Riehen, in Oberwil BL		Kollektivunterschrift zu zweien
16			Schillinger, Erwin, von Basel, in Oberwil BL		Kollektivunterschrift zu zweien
16			Walther, Jörg, von Oberentfelden, in Aargau		Kollektivunterschrift zu zweien
17		30	Kornacker, Dr. Peter, von Oberwil BL, in Oberwil BL		Kollektivunterschrift zu zweien
18			Lehner, Dr. Ulrich, deutscher Staatsangehöriger, in Düsseldorf (D)		ohne Zeichnungsbe- rechtigung
18			Choffat, Dr. Paul, von Soubey, in Paudex		Kollektivunterschrift zu zweien
21			Huggenberger, Dr. Thomas, deutscher Staatsangehöriger, in Aarburg		Kollektivunterschrift zu zweien
22			Fishman, Dr. Marc Charles, Bürger der USA, in Newton Center (MA, USA)		Kollektivunterschrift zu zweien



222
222

Handelsregisteramt Basel-Stadt

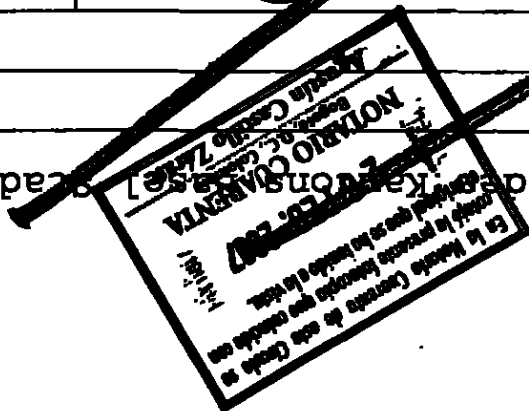


Dieser Auszug aus dem kantonalen Handelsregister hat ohne die nebenstehende Originalbeglaubigung keine Gültigkeit. Er enthält alle gegenwärtig gültigen Eintragungen sowie alle seit 01.03.1996 gestrichenen Eintragungen. Auf besonderes Verlangen kann auch ein Auszug erstellt werden, der lediglich alle gegenwärtig gültigen Eintragungen enthält.

Basel, 11.02.2005 10:16

St. Nr.	Id.	Personenangaben	Funktion	Zeichnungsart
23		Datar, Prof. Dr. Bränt, indischer Staatsangehöriger, in	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
23		Weston (MA, USA)	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
23		Wiedeking, Dr. Wendelin, deutscher Staatsangehöriger, in	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
23	32m	Bietigheim-Bisingen (D)	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
23		Köster, Steven, Bürger des US, in Basel	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
23		Kessler, Dr. Barbara, von Davos und Schiers, in Zürich	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
24	28m	Reinhold, Dr. Jürgen, deutscher Staatsangehöriger, in	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
24		Reinhold (D)	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
25		Hertling, Prof. Dr. Paul, von Wettwil am Albis, in	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
25		Kilchberg KH	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
25		Barup, Mate, schwedischer Staatsangehöriger, in Basel	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
26		Norwelts, Martin, deutscher Staatsangehöriger, in	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
26		Schöpfheim (DE)	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
26		Brotschky-Welger, Dr. Jürgen, deutscher Staatsangehöriger, in	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
26		Im Lörach (DE)	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
30		Wipfl, Daniel, von Kappel, in Dübendorf	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
31		Evans, Susan genannt Sue, britische Staatsangehörige, in	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
31		Mutens	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
31		de Weerd, Dr. Peter, niederländischer Staatsangehöriger, in	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
31		Hofstetten SO	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
31		Mans, Anja, deutsche Staatsangehörige, in Hagnendorf	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
31		Over, Dr. Uwe, deutscher Staatsangehöriger, in Au (DE)	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
31		Pfister, Michel, von Bern und Murgenthal, in Therwil	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
32		Haynen, Bruno, von Bellach und Ausserberg, in Bolochurn	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
32		Kolmar, Steven, amerikanischer Staatsangehöriger, in Basel	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
32		Kornicker, Dr. Peter, von Oberwil BL, in Oberwil BL	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart
32		Pelzer, Robert, kanadischer Staatsangehöriger, in Basel	Mitglied des Verwaltungsrates	ohne Zeichnungsart

Handelsregisteramt Basel-Stadt	Handelsregisteramt Basel-Stadt	Handelsregisteramt Basel-Stadt	Handelsregisteramt Basel-Stadt
--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------



Handelsregisteramt Basel-Stadt

Für getreue Fotokopie

Basel, den 16. (sechzehnten) Februar 2005 (zweitausendfünf)

M. Staehelin, Notar

Dr. M. Staehelin
Notar

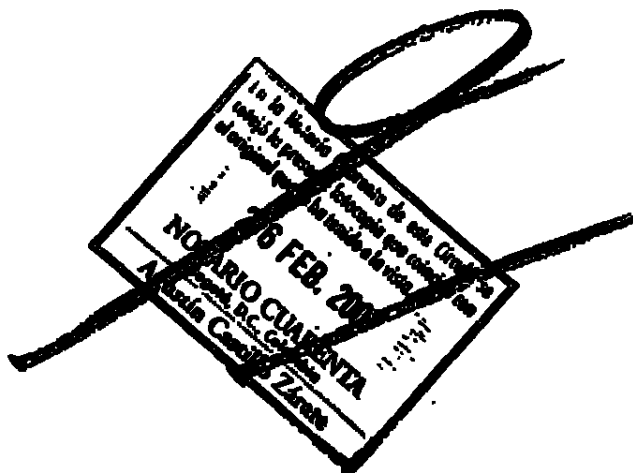
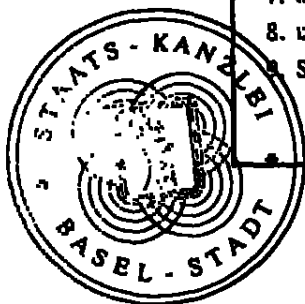
Leg.Prot.Nr. 135 / 2005

APOSTILLE
(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Schweiz (Suisse)
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von *M. Staehelin*
3. in seiner Eigenschaft als *off. Notar*
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des (der) *Basel-Stadt*

Bestätigt **17. Feb. 2005**

5. in Basel (Bâle) 6. am
7. durch die Staatskanzlei des Kantons Basel-Stadt
8. unter Nr. *1027/2005*
9. Siegel/Stempel: 10. Unterschrift: *Fischer*



28/229

Certificación

Yo, el suscrito Notario Público en Basilea, Suiza, por el presente certifico que las firmas anteriores son las firmas auténticas de la Sra. June Violet Mentel, ciudadana de Grenchen/SO, Suiza, con domicilio en Arlesheim, Suiza y del Sr. Reto Halbeisen, ciudadano de Wahlen/BL, Suiza, con domicilio en Laufen, Suiza, ambos actuando en representación de Novartis AG, en Basilea, Suiza, ambos en calidad de apoderados, ambos con firma conjunta.

La autenticidad de las firmas se estableció mediante comparación.

BASILEA, este 24 (veinticuatro) de octubre de 2005 (dos mil cinco).

(Firmado)

El documento lleva un sello circular que reza:

Dr. MATTHIAS STAEHELIN

NOTARIO BASILEA

Leg. Prot. No. 879/2005

El documento tiene la siguiente apostilla:

APOSTILLE (Hague Convention of October 5th, 1961)

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 1. País: | Suiza |
| Este documento oficial | |
| 2. está firmado por | El Doctor en Ciencias Jurídicas |
| 3. actuando en calidad de | Notario Público |
| 4. y está certificado por el sello | Del mencionado notario |

CERTIFICADO

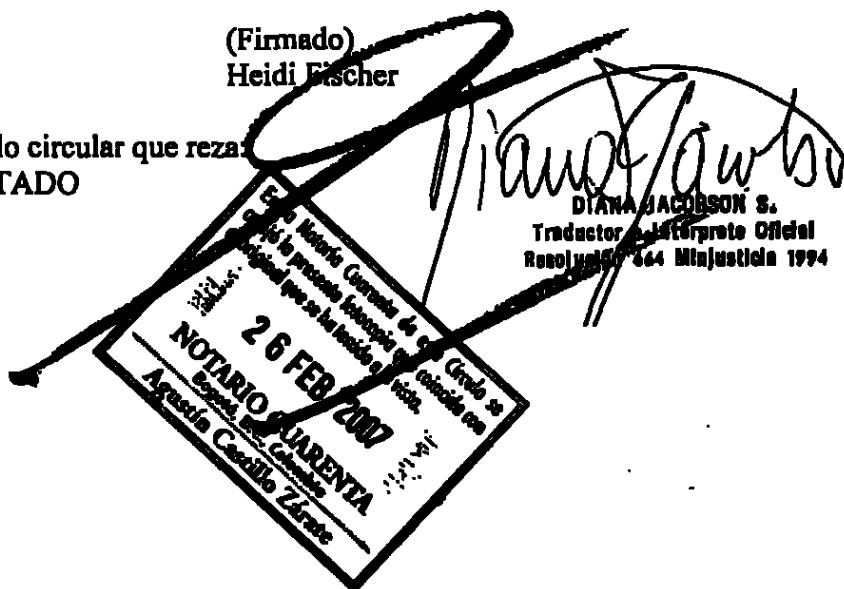
- | | |
|--|-----------------------------|
| 5. en Basilea | 6. el 25 de octubre de 2005 |
| 7. por la Cancillería del Estado del Cantón de Basilea | |
| 8. No. 10'036/17'028 | |
| 9. Sello | 10. Firma: |

(Firmado)
Heidi Fischer

El documento lleva un sello circular que reza:

CANCELLERÍA DEL ESTADO

CIUDAD DE BASILEA



DIANA JACOBSON S.
Traductor e Interpreté Oficial
Resolución 664 Minjusticia 1994

2150 230

Bogotá, D.C., 15 de diciembre de 2005

Traducción Oficial Número 033/05

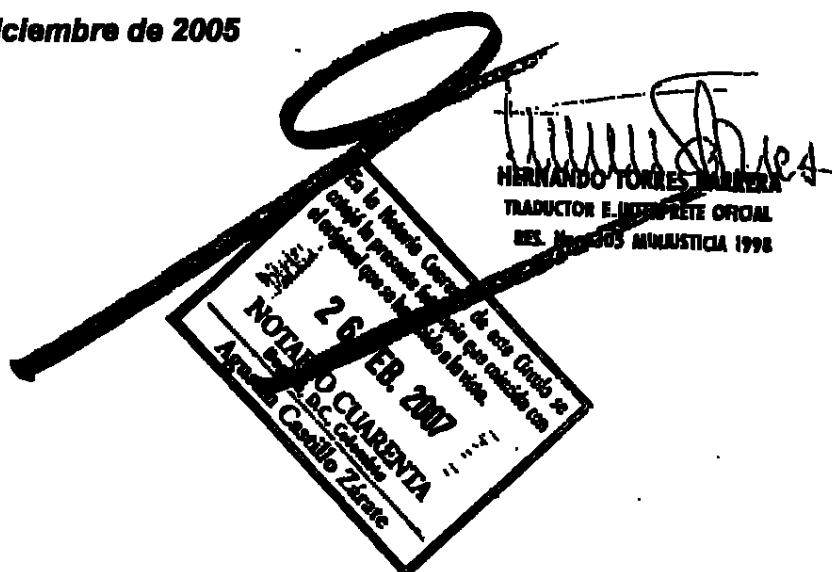
**elaborada por Hernando Torres Barrera, traductor e intérprete oficial según
resolución número 01305, expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el
11 de diciembre de 1998.**

**La presente traducción del idioma alemán al español de 6 (seis) páginas,
provistas todas y cada una con la firma y el sello del traductor oficial,
corresponde en su totalidad al**

**REGISTRO MERCANTIL DEL CANTÓN CIUDAD DE BASILEA DE
LA FIRMA NOVARTIS AG
Y APOSTILLA**

**Es traducción completa, fiel y conforme, de la cual queda copia en el archivo del
traductor para su confrontación, a la cual me remito.**

Bogotá, D.C., 15 de diciembre de 2005





HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 ADMINISTRACION 1998



R gistro Mercantil del Cantón Ciudad de Basilea
Registro Principal

232

CH-270.3.002.061-2	Novartis AG	Basilea	2
--------------------	-------------	---------	---

Todas las inscripciones

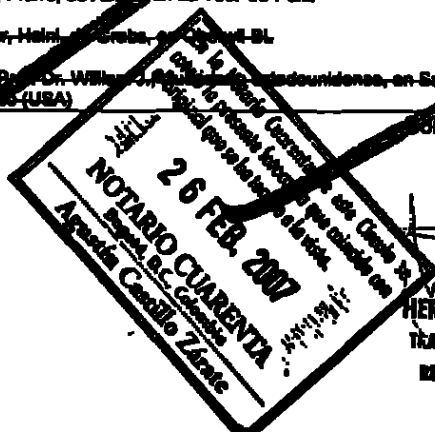
Tipo de firma	Ref.	No. Diario	Fecha Diario	SHAB	Fecha SHAB	Página	Tipo de firma	Ref.	No. Diario	Fecha Diario	SHAB	Fecha SHAB	Página
SE	1	1113	01.03.1998	80	12.03.1998	1422	BR	18	2818	24.05.2002	103	31.05.2002	8
TH	2	1214	07.03.1998	55	18.03.1998	1584	BR	19	2722	31.05.2002	108	07.06.2002	8
PN	3	1904	19.04.1998	84	01.05.1998	2487	KU	20	3448	08.07.2002	132	11.07.2002	5
PN	4	3182	05.07.1998	140	22.07.1998	4388	SB	21	5158	02.10.2002	195	09.10.2002	5
TH	5	8560	20.12.1998	8	13-01.1997	183	SB	22	8388	05.12.2002	241	12.12.2002	5
SC	6	1381	11.03.1997	57	25.03.1997	2021	KU	23	3814	18.08.2003	118	24.08.2003	8
TH	7	1888	27.04.1999	86	04.05.1999	2920	BR	24	8978	20.10.2003	208	27.10.2003	8
ME	8	5418	28.11.1999	237	08.12.1999	8242	SE	25	8814	03.12.2003	238	10.12.2003	6
ME	9	5717	14.12.1999	248	21.12.1999	8838	SB	26	912	16.02.2004	38	23.02.2004	5
HE	10	2773	09.08.2000	117	19.08.2000	4115	SE	27	1798	02.04.2004	70	13.04.2004	5
JO	11	5085	24.10.2000	212	31.10.2000	7405	SU	28	B 1894	08.04.2004	B 74	18.04.2004	8
SB	12	5501	15.11.2000	228	22.11.2000	7832	KU	29	2707	02.08.2004	108	08.08.2004	8
EB	13	538	25.01.2001	22	01.02.2001	789	FE	30	2848	08.08.2004	112	14.08.2004	6
TH	14	2512	07.05.2001	90	10.05.2001	3527	SB	31	5214	01.10.2004	185	07.10.2004	5
SC	15	2730	16.06.2001	98	23.06.2001	3880	SB	32	6198	18.11.2004	230	25.11.2004	5
SB	16	578	28.01.2002	23	04.02.2002	8							
SE	17	1015	22.02.2002	42	01.03.2002	8							

Inscrip.	Modif.	Cancel.	Datos Personales	Cargo	Tipo de Firma
1		2m	Walter, Dr. Rolf, de Zurich y Zurich, en Thaili	Miembro del Consejo de Administración	Firma individual
1		3	Treuhand-Gesellschaft Peter-Eisler, en Marthalen	Auditoria	
2		7	Kreuer, Dr. Alex, de Basilea, en Riehen	Presidente y Delegado del Consejo de Administración	Firma colectiva de a dos
2			Rudloff, Hans-Jörg, ciudadano alemán, en Hermance	Vicepresidente del C. Administración	Firma colectiva de a dos
2		8m	Sihler, Prof. Dr. Helmut, ciudadano suizo, en Pörschach am Würthensee (A)	Vicepresidente del C. Administración	Firma colectiva de a dos
2		7m	Vassili, Dr. Daniel L., von Pöschingen, en Binningen	Delegado del C. Administración	Firma colectiva de a dos
2	2	8	Walter, Dr. Rolf, de Zurich y Zurich, en Thaili	Miembro del C. Administración	Firma colectiva de a dos
2		10m	Bärtscher, Dr. Urs, de Thal, en Berna		Firma colectiva de a dos
2		6	Böhrer, Dr. Martin, de Aesch, en Binningen		Firma colectiva de a dos
2		10m	Brau, Dr. Raymond, de Oberagg, en Binningen		Firma colectiva de a dos
2			Manser, John, de Appenzell, en Riehen		Firma colectiva de a dos
2		5	Meyer, Rolf A., de Wohlen AG, en Basilea		Firma colectiva de a dos
2		5	Müller, Dr. Hans Ulrich, de Winterthur, en Hofstetten SO		Firma colectiva de a dos
2		8	Oppikoff, Dr. Ulrich, de Berna y Sigershausen, en Seltisberg		Firma colectiva de a dos
2		5	Rupprecht, Peter, de Basilea, en Aesch-BL		Firma colectiva de a dos
2		5	Sihler, Dr. Peter, de Lucerne, en Allschwil		Firma colectiva de a dos
2			Vierkötter, Jürgen, ciudadano alemán, en Böckten		Firma colectiva de a dos
3		4m	Schweizerische Treuhandgesellschaft Coopers & Lybrand AG, en Basilea	Auditoria	
4		8	STG Coopers & Lybrand AG, en Basilea	Auditoria	
4		8	Argenti, Prof. Dr. Dello, de Lugano, en Zurich	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firma
5		8m	Breuer, Birgit, ciudadana alemana, en Berlin (D)	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firma
5			Burkhardt, Prof. Dr. Peter, de Basilea, en Pully	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firma
5		8	Cassani, Dr. Kasper V., de Böschwil y Zurich, en Uriken	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firma
5		18	Georg, Dr. Hans Ulrich, de Appenzell, en Zurich	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firma
5		27	Frehner, Walter G., de Herten, en Riehen	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firma
5		10	Conillard, Robert L., de Onex, en Ginebra	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firma
5			Landolt, Pierre, de Appenzell La Tour-de-Peilz	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firma
5		8m	Lippuner, Heinz, de Grenchen, en Grenchen-BL	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firma
5		8	Rutter, Dr. Dr. William S., de San Francisco, en San Francisco (USA)	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firma



Basilea, 11.02.2005 10:16

continúa en la siguiente página 3



HERNANDO TORRES BARRERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998



Registro Mercantil del Cantón Ciudad de Basilea Registro Principal

233

CH-270.3.002.061-2

Novartis AG

Basilea

3

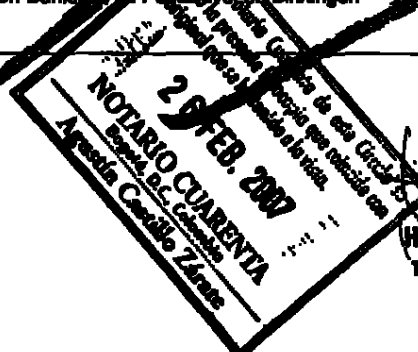
Todas las Inscripciones

Inscrip.	Modif.	Cancel.	Datos personales	Cargo	Tipo de Firma
5		10	Wander, Dr. Jean, de Bern, en Muri, en inmediaciones de Berna	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firmar
5		8m	Jetzer, Alexandra, de Basilea, y Langnau AG, en Zug	Miembro del C. Administración	Firma colectiva de a dos, no como C. Administración
5			Duplein, Dr. Ingrid, de Basilea, en Hofstetten SO	Secretaria (no Miembro)	Firma colectiva de a dos
5		23	Becker, Dr. Konrad, de Basilea, en Bettingen		Firma colectiva de a dos
5		24	Bedner, Sheila, de Weid, en Reinach BL		Firma colectiva de a dos
6		8	Bradley, Dr. Claude Glendon, ciudadano estadounidense, en Alpharetta (Georgia USA)		Firma colectiva de a dos
5		8	Deusse, Pierre, ciudadano francés, en Basilea		Firma colectiva de a dos
5		15	Eberle, Louis, de Sionneville y Zurich, en Basilea		Firma colectiva de a dos
5			Grubb, Dr. Philip, ciudadano británico, en Inzlingen (D)		Firma colectiva de a dos
5		21	Gürler, Hans-Bert, de Basilea, en Lupatzen		Firma colectiva de a dos
5		13	Hammen, Dr. Heinz, ciudadano alemán, en Möhlin		Firma colectiva de a dos
5		23	Haring, Dr. Werner, ciudadano alemán, en Lärzsch (D)		Firma colectiva de a dos
5			Haltz, Peter, de Basilea, en Basilea		Firma colectiva de a dos
5		24	Herrlich, Dr. Martin, de Basilea, en Basilea		Firma colectiva de a dos
5		13	Imhof, Heinz P., de Fretlenwil, en Riehen		Firma colectiva de a dos
5		8	Jeannot, Roland, de Travers, en Ginebra		Firma colectiva de a dos
5			Kaufmann, Dr. Max, de Zurich, en Riehen		Firma colectiva de a dos
5		13	Kindler, Dr. Hans, de Bolligen, en Slesach		Firma colectiva de a dos
5			L'Eplattenier, Dr. François, de Les Geneveys-sur-Coffrane, en Hofstetten SO		Firma colectiva de a dos
5		13	Mäder, Christoph, de Zurich, en Bettingen		Firma colectiva de a dos
5			Morris, Clive, ciudadano británico, en Riehen		Firma colectiva de a dos
5			Mostel, Heinz, de Basilea, en Hofstetten SO		Firma colectiva de a dos
5		8	Pyatt, David E.L., ciudadano británico, en Bettingen		Firma colectiva de a dos
5		8	Reichenstein, Katharina, de Pratteln, en Basilea		Firma colectiva de a dos
5		8	Sarno, Dr. Wolfgang, de Riehen, en Riehen		Firma colectiva de a dos
5		13	Smolders, Walter, ciudadano belga, en Ettingen		Firma colectiva de a dos
5		8	Syfrig, Bruno, de Heris, en Muttenz		Firma colectiva de a dos
5		30	Tobler, Dr. Peter, de Ettingen y Thal, en Ettingen		Firma colectiva de a dos
5		8	Wagnière, Daniel C., von Rueyas y Fey y Cologny, en Binningen		Firma colectiva de a dos
5		10	Von warburg, Prof. Dr. Walter P., de Aarburg, en Riehen		Firma colectiva de a dos
5		25	Yorke, Brian Alan, de Albstatten, en Binningen		Firma colectiva de a dos
6		10	Buchli, Anka, de Versam, en Basilea		Firma colectiva de a dos
6			Chastham, Malcolm B., ciudadano británico, en Münchenstein		Firma colectiva de a dos
6			Elchhorn, Felix, de Basilea, en Basilea		Firma colectiva de a dos
6			Lindenberg, Guido, de Fretlenwil, en Emmetten		Firma colectiva de a dos
6		8	Note, François, ciudadano francés, en Basilea		Firma colectiva de a dos
	7	8m	Vasella, Dr. Daniel, de Bettingen, en Binningen	Presidente y Delegado C. Administración	Firma colectiva de a dos



Basilea, 11.02.2005 10:15

Continúa en la siguiente página 4



Hernando Torres Barrera
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 ANNUSTICIA 1998



R gistro Mercantil d l Cantón Ciudad de Basil a Registro Principal

CH-270.3.002.061-2

Novartis AG

Basilea

4

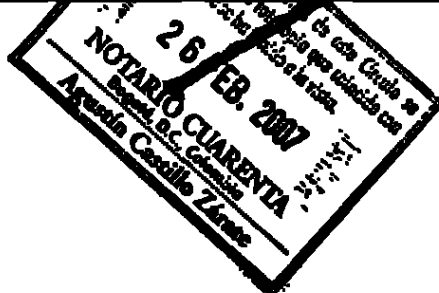
Todas las inscripciones

Inscrip.	Modif.	Cancel.	Detos personales	Cargo	Tipo de Firma
8	8	16m	Jetzer, Alexandre, de Basilea y Langnau AG, en Zug	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firmar Sin autorización
8			George, William W., ciudadano estadounidense, en Minneapolis (MN USA)		
8			Zirkemagel, Prof. Dr. Rolf M., de Riehen, en Zúrich	C. Administración Miembro del	de-firmar Sin autorización de firmar
	8		Sihler, Prof. Dr. Helmut, ciudadano austriaco, Pörschach am Wörthersee (A)	C. Administración Vicepresidente y Delegado del	Firma colectiva de a dos
	8		Vasella, Dr. Daniel L., de Poschiero, en Riech	C. Administración Presidente y Delegado del	Firma colectiva de a dos
	8	27	Uppuner, Heini, de Glets, en Oberwil BL	C. Administración Miembro del	Firma colectiva de a dos
	8		Breuel, Birgit, ciudadana alemana, en Hannover (D)	C. Administración Miembro del	Sin autorización de firmar
8		13	Atkin, Dr. John, ciudadano británico, en Dietwil (F)	C. Administración	Firma colectiva de a dos
8			Brändli, Reto, de Zurich y Kriens, en Basilea		Firma colectiva de a dos
8			Ebeling, Thomas, ciudadano alemán, en Muri en inmediaciones de Berna		Firma colectiva de a dos
8		16	Karabatas, Dr. Argeris Jerry, ciudadano estadounidense, en Ariesheim		Firma colectiva de a dos
8		24	Walker, Norman, ciudadano británico, en Basilea		Firma colectiva de a dos
8		13m	Witwer, Reto, de Linden, en Zug		Firma colectiva de a dos
9	10		PricewaterhouseCoopers AG, en Basilea	Auditoria	
	10		Bärlocher, Dr. Urs, de Thal, en Riehen		Firma colectiva de a dos
	10		Brau, Dr. Raymond, de Oberegg, en Bottingen		Firma colectiva de a dos
10		23	Moser, Hans J., ciudadano alemán, en Riehen		Firma colectiva de a dos
10		18	Piergallini, Alfred, conocido como Al, ciudadano estadounidense, en Jersey City (USA)		Firma colectiva de a dos
10			Schutz, Woldemar, ciudadano alemán, en Basilea		Firma colectiva de a dos
10		30	Waser, Dieter, ciudadano alemán, en Stauven		Firma colectiva de a dos
11			Miller, George L., Ciudadano estadounidense, en Oberwil BL		Firma colectiva de a dos
13		31	Boller, Heinz, de Gessau ZH, en Riehen		Firma colectiva de a dos
13			Dietz, Dr. Jörg, ciudadano alemán, en Allschwil		Firma colectiva de a dos
13			Rupprecht, Peter, de Basilea, en Aesch BL		Firma colectiva de a dos
13		18	Wenzel, Dr. Gilbert, ciudadano alemán, en Küssnacht ZH		Firma colectiva de a dos
	13	23	Witwer, Reto, de Linden, en Dietikon		Firma colectiva de a dos
15		22	Bürkin, Nio, de Basilea, en Basilea		Firma colectiva
	16		George, William W., ciudadano estadounidense, en Minneapolis (MN USA)	Miembro del C. Administración	de a dos Firma colectiva de a dos
16		25	Frey, Johannes, de St. Gallen, en Basilea		Firma colectiva de a dos
16			Höfn, Kurt, de Kalten y Riehen, en Oberwil BL		Firma colectiva de a dos
16			Schilling, Erwin, de Basilea, en Oberwil BL		Firma colectiva de a dos
16			Walther, Jörg, de Oberentfelden, en Aarau		Firma colectiva de a dos
17		30	Kornicker, Dr. Peter, de Oberwil BL, en Oberwil BL		Firma colectiva de a dos
18			Lehner, Dr. Ulrich, ciudadano alemán, en Düsseldorf (D)	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firmar
18			Choffat, Dr. Paul, de Soubey, en Evian		Firma colectiva de a dos
21			Huggenberger, Dr. Thomas, ciudadano alemán, en Aarburg		Firma colectiva de a dos
22			Fishman, Dr. Marc, ciudadano estadounidense, en Newton Center (MA, USA)		Firma colectiva de a dos



Basilea, 11.02.2005 10:16

Continúa en la siguiente página 5



[Signature]
HERNANDO TORRES RAMIREZ
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
M.E. No. 1203 MINISTECIA 1998



Registro Mercantil del Cantón Ciudad de Basilea
Registro Principal

235

CH-270.3.002.001-2	Novartis AG	Basilea	5
--------------------	-------------	---------	---

Todas las inscripciones

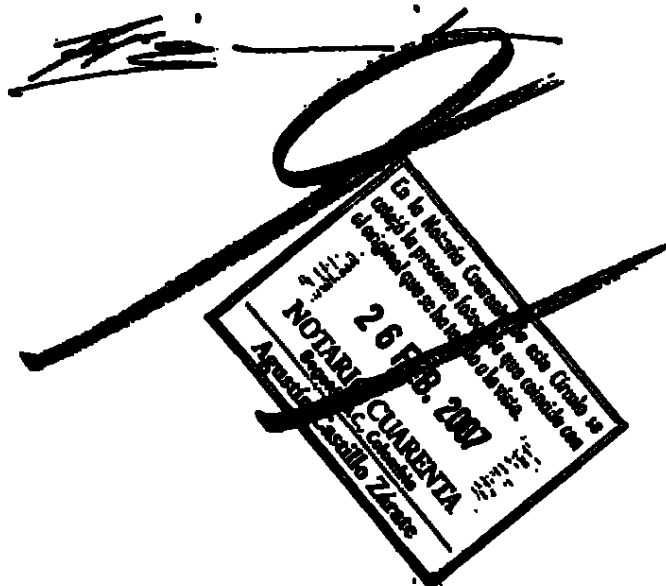
Inscrip.	Modif.	Cancel.	Datos personales	Cargo	Tipo de Firma
23			Datar, Prof. Dr. Srikanth, ciudadano indio, en Weston (MA, USA)	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firmar
23			Wiedeking, Dr. Wendelin, ciudadano alemán, en Blotzheim-Bisingen (D)	Miembro del C. Administración	Sin autorización de firmar
23		32m	Kelmar, Steven, ciudadano estadounidense, en Allschwil		Firma colectiva de a dos
23			Kessler, Dr. Barbara, de Davos y Schiers, en Zurich		Firma colectiva de a dos
24		28m	Brokatzky, Dr. Jürgen, ciudadano alemán, en Lörrach (D)		Firma colectiva de a dos
25			Hemling, Prof. Dr. Paul, de Wattwil am Albis, en Klichberg ZH		Firma colectiva de a dos
25			Parup, Mats, ciudadano sueco, en Basilea		Firma colectiva de a dos
28			Morawietz, Martin, ciudadano alemán, en Schopfheim (DE)		Firma colectiva de a dos
	28		Brokatzky-Gelger, Dr. Jürgen, ciudadano alemán, en Lörrach (DE)		Firma colectiva de a dos
30			Wipfl, Daniel, de Ennfeld, en Döbendorf		Firma colectiva de a dos
31			Evans, Susan, conocida como Sue, ciudadana británica, en Muttenz		Firma colectiva de a dos
31			de Weerd, Dr. Peter, ciudadano holandés, en Hofstetten SO		Firma colectiva de a dos
31			Marz, Anja, ciudadana alemana, en Hügendorf		Firma colectiva de a dos
31			Over, Dr. Uwe, ciudadano alemán, en Au (DE)		Firma colectiva de a dos
31			Fluss, Michel, de Bern y Murgenthal, en Therwil		Firma colectiva de a dos
32			Heynen, Bruno, de Bülach y Auserberg, en Solothurn		Firma colectiva de a dos
	32		Kelmar, Steven, ciudadano americano, en Basilea		Firma colectiva de a dos
32			Komicker, Dr. Peter, de Oberwil BL, en Oberwil BL		Firma colectiva de a dos
32			Peizer, Robert, ciudadano canadiense, en Basilea		Firma colectiva de a dos

Basilea, 11.02.2005 10:18

El presente extracto tomado del Registro Mercantil cantonal no tiene ninguna validez sin la autenticación del original puesta al pie. Este extracto contiene todas las inscripciones válidas actualmente para esta empresa, así como las eventuales inscripciones tachadas desde el 01.03.1996.
A solicitud especial se puede expedir un extracto que contenga únicamente todas las inscripciones válidas en la actualidad.



Oficina de Registro Principal Ciudad de Basilea



Hernando Torres Barrera
HERNANDO TORRES BARRERA
7: ADOCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES.-No.-1303-MINISTERIO 1998

Es fotocopia fiel

Basilea, a los 16 (dieciséis) días del mes de febrero de 2005 (dos mil cinco)

HILO Y OBLEA NOTARIAL: Dr. MATTHIAS STAEHELIN – NOTARIO EN BASILEA

Legalización Protocolo No. 135 / 2005

APOSTILLA
(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

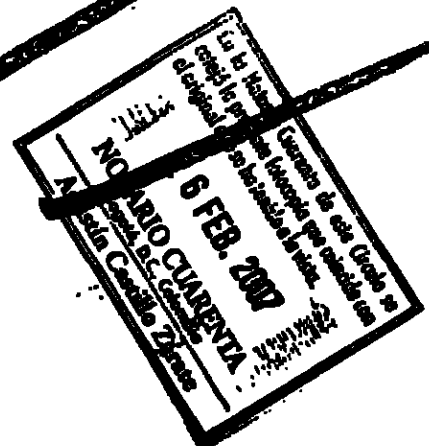
1. País: Suiza (Suisse)
Este documento público
2. está firmado por el DR. EN CIENCIAS JURIDICAS M. STAEHELIN
3. en su condición de NOTARIO PUBLICO
4. lleva el sello/timbre del MENCIONADO NOTARIO

Confirmado

5. en Basilea (Bâle)
6. el 17 de febrero de 2005
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea
8. bajo el No. 1'827/2'627
9. Sello / timbre:
10. Firma: (ilegible)

.....
Heidi Fisher

SELLO: CANCELLERÍA DE ESTADO – CIUDAD DE BASILEA.




HERNANDO TORRES BAURERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 1305 MINJUSTICIA 1998

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

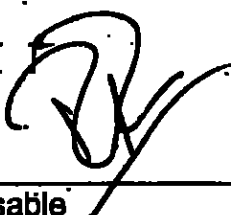
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable 

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

238

AS: 103.276

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 Rad: 07-U21228-00000-0000
 POC 28/01/08-02/12/2010 LOP. 20/01/08-02/12/2010
 INS. 11 PATENTE
 ENE 3/01/08-02/12/2010
 AG 411 PRESENTACION FORNE 240

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
 PCT
 ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: GENENTECH, INC. y NOVARTIS, AG Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990, US; Lichstrasse 35, Basel CH-4058, Suiza (Respectivamente) Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos y Suiza Lugar de Constitución: Estados Unidos y Suiza Teléfono: Fax E-mail	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Carrera 7 # 71-21 Torre B - Piso 4 Teléfono: 744-2200 Fax 744-2700 E-mail:	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 80.410.337 TP 57492	
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Charles Matthew Winter Dirección: 2433 Coronel Blvd., Belmont, CA 94002, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2005/031844</u> Fecha <u>08-09-2005</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2006/031580 A3</u> Fecha <u>23-03-2006</u>			
6 Título (54): <u>PROCESO PARA LA CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS Y PRODUCTOS TERAPÉUTICOS DE LOS NIÑOS</u>			
7 Clasificación Internacional (51) _____			
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US	08-09-2004	60/809.082
	US	08-09-2005	11/220.362

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

151 239

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar composiciones de anticuerpos altamente concentrados **CARACTERIZADO** porque comprende:

una primera ultrafiltración de una primera preparación de anticuerpos para obtener una segunda preparación de anticuerpos;

una diafiltración de la segunda preparación de anticuerpos para obtener una preparación de anticuerpos intermedia diafiltrada; y

una segunda ultrafiltración de la preparación de anticuerpos intermedia diafiltrada para obtener una tercera preparación de anticuerpos;

en donde, una o más de la primera ultrafiltración, segunda ultrafiltración, y la diafiltración se logran de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **CARACTERIZADO** porque una o más de la primera ultrafiltración, segunda ultrafiltración, y diafiltración se logran de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **CARACTERIZADO** porque una o más de la primera ultrafiltración, segunda ultrafiltración, y diafiltración se logran de aproximadamente 45 °C.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **CARACTERIZADO** porque una o más de la primera ultrafiltración, segunda ultrafiltración, y diafiltración se logran de aproximadamente 45 °C, más o menos 5 °C.

240

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.
NOVARTIS AG

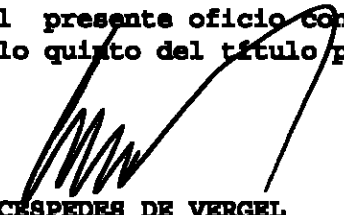
REFERENCIA	Radicación No.	07 21228
	Solicitud internacional	PCT/US2005/031844
	Fecha inicio fase nacional	09/04/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6554

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 01 JUN 2020
adpall